



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GLADSLENE GÓES SANTOS FRAZÃO

**ELABORAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA
INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia ovata* Cambessedes COM
POTENCIAL PARA CONSERVAÇÃO DE MANGABAS**

SÃO CRISTOVÃO - SERGIPE

2016



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS

GLADSLENE GÓES SANTOS FRAZÃO

ELABORAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA
INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia ovata* Cambessedes COM
POTENCIAL PARA CONSERVAÇÃO DE MANGABAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biotecnologia como requisito final para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA.

Orientador: Prof Dr Gabriel Francisco da Silva

Coorientadora: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

SÃO CRISTOVÃO – SERGIPE

2016

GLADSLENE GÓES SANTOS FRAZÃO

ELABORAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA
INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia ovata* Cambessedes COM
POTENCIAL PARA CONSERVAÇÃO DE MANGABAS

PARECER DO JULGAMENTO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO

COMISSÃO EXAMINADORA:

São Cristóvão/SE, _____ de _____ de _____.

Prof Dr Gabriel Francisco da Silva
Orientador / Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia -
RENORBIO

Profª Drª Luciana Cristina Lins de
Aquino Santana
Coordenadora/ Departamento de
Tecnologia de Alimentos - UFS

Profª Drª Juliana Cordeiro Cardoso
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia - RENORBIO

Drª Ana Veruska Cruz da Silva Muniz
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros

Prof Dr José Antonio Barreto Alves
Departamento de Enfermagem –
Hospital Universitário de Sergipe

Prof Dr Gabriel Isaías Lee Tuñon
Departamento de Medicina Veterinária
- UFS

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

F848e Frazão, Gladslene Góes Santos.
Elaboração de coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambessedes com potencial para conservação de mangabas / Gladslene Góes Santos Frazão; orientador Gabriel Francisco da Silva . – São Cristóvão, 2016.
102 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Agentes anti-infecciosos. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Revestimentos. 4. Mangaba. I. Silva, Gabriel Francisco da , orient. II. Título.

CDU 606:665.52/.54

AGRADECIMENTOS

Chegando ao final de mais um ciclo de minha vida e abrindo mais uma etapa importante, com novos desafios a serem corajosamente enfrentados e vencidos não poderia deixar de agradecer, mais uma vez, a Deus por ter me dado força, coragem e determinação nessa trajetória.

As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais: Gladston e Carlis, minhas irmãs e amigas: Michelle, Carol e Angela e meu esposo Raphael pelos ensinamentos, incentivos e apoio incondicional em todos os momentos;

A minha professora e amiga Dr^a Rita de Cássia Trintade pela oportunidade e confiança de ingressar no doutorado e pelas orientações;

A minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana Aquino por aceitar a me orientar no decorrer do curso, ter confiado em mim e compartilhado seus conhecimentos, não medindo esforços, sempre disposta a me auxiliar;

Ao Prof^o Dr Gabriel Francisco da Silva por aceitar o convite para orientação no final do segundo tempo e confiança no término do doutorado;

Ao Prof^o Dr Arie Blank pela colaboração em disponibilizar os óleos essenciais;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos de Doutorado;

Ao Prof^o Dr. Antonio Marcio por deixar a disposição o LMA – UFS;

A Isabela de Jesus, companheira de laboratório, pela ajuda sem a qual tudo seria mais difícil;

As amigas e companheiras de turma: Bernadeth e Ioná, a Sérgio (cunhado) e a todos meus amigos, alunos e ex-alunos pela amizade, momentos compartilhados e pelo incentivo e colaboração;

Enfim a todos que de alguma forma, direta ou indireta, me ajudaram.

Muito obrigada!

RESUMO

As coberturas comestíveis são definidas como uma camada fina de material comestível, geralmente aplicada na forma líquida sobre o produto, por imersão do mesmo. Várias pesquisas têm demonstrado que a adição de substâncias bioativas como os óleos essenciais têm aumentado o potencial antimicrobiano destas embalagens contribuindo para o aumento da vida de prateleira de alimentos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar *in vitro* e *in situ* a eficiência microbiológica de coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleos essenciais de *Myrcia ovata* Cambessedes (MYRO). O potencial antimicrobiano de 9 óleos essenciais foi avaliado *in vitro* através da técnica de difusão em discos frente à bactérias patogênicas de alimentos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*). Devido a maior disponibilidade dos óleos MYRO-174 e MYRO-175 e sendo as bactérias Gram-positivas de muito sensíveis a extremamente sensíveis aos mesmos, estes foram selecionados para a incorporação nas coberturas comestíveis a base de quitosana. As formulações de coberturas comestíveis foram elaboradas variando-se as concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial conforme o delineamento composto central rotacional ($2^3 + 6$ pontos axiais e 3 pontos centrais). As bactérias foram sensíveis às coberturas com halos de inibição entre 9,0 –12,5 mm. As formulações contendo o óleo MYRO-175 foram otimizadas para a inibição de *B. cereus* e *B. subtilis* utilizando a metodologia de superfície de resposta, sendo possível obter um modelo matemático preditivo para a inibição das mesmas. A concentração de óleo essencial foi o parâmetro significativo para a atividade antimicrobiana das coberturas. As coberturas comestíveis incorporadas com o óleo MYRO 174 ou MYRO-175 (1,0% de fécula de mandioca, 1,0% de quitosana e 1,25% de óleo essencial) foram aplicadas em mangabas e o potencial antimicrobiano foi avaliado frente a microbiota e ao *Bacillus cereus* artificialmente contaminado nos frutos. As mangabas revestidas com cobertura comestível apresentaram contagens de bactérias aeróbias mesófilas totais da ordem de 10^2 UFC/g, bolores e leveduras < 10 UFC/g (valor estimado) e inibição do crescimento de *B. cereus* por 12 dias de

armazenamento a 10°C. Já as mangabas sem revestimento (controle) apodreceram a partir do 8º dia de estocagem refrigerada. As coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes demonstraram potencial para serem utilizadas como alternativa no controle microbiológico *in vitro* de bactérias patogênicas de alimentos e *in situ* na conservação de mangabas.

Palavras-chave: embalagem, agente antimicrobiano natural, frutas.

ABSTRACT

The edible coatings are defined as a thin layer of edible material usually applied in liquid form on the product by immersing the same. Several studies have shown that the addition of bioactive substances such as essential oils have increased antimicrobial packaging potential of these, contributing to the increased food shelf life. Thus, this study aimed to develop and evaluate *in vitro* and *in situ* microbiological efficiency of edible coatings to chitosan base incorporated with essential oils of *Myrcia ovata* Cambess (MYRO). The antimicrobial potential of 9 essential oils (EOs) was evaluated *in vitro* by diffusion technique in discs against foodborne bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enteritidis*). Due to greater availability of MYRO-174 and MYRO-175 oils and being gram-positive bacteria very sensitive to extremely sensitive to them, these were selected for incorporation into edible eatable coatings of chitosan base. The edible coatings formulations were prepared ranging cassava starch, chitosan and essential oil concentrations according the central composite rotational design ($2^3 + 6$ axial points and 3 central points). The bacteria were sensitive to edible coatings with diameters of inhibition zone between 9.0 -12.5 mm. The edible coatings formulations containing MYRO-175 oil were optimized for the *B. Cereus* and *B. subtilis* inhibition using the response surface methodology, a predictive mathematical model for the inhibition of them was obtained. The essential oil concentration was the more significant parameter to antimicrobial activity of coatings. The edible coatings incorporated with MYRO-174 oil or MYRO-175 (1.00% cassava starch, 1.00% chitosan and 1.25% essential oil) were applied in mangabas and the antimicrobial potential against natural microflora and *Bacillus cereus* artificially contaminated in the fruits was studied. The coated mangabas showed total mesophilic aerobic bacteria counts the order of 10^2 CFU/g, molds and yeasts <10 CFU/g (estimated value) and inhibition of growth of *B. cereus* for 12 days of storage at 10°C. On the other hand, uncoated mangabas (control) rotted from the 8th day of refrigerated storage. The edible coatings based in chitosan incorporated with *M. ovata* Cambess. EOs

demonstrated potential to be used as an alternative *in vitro* microbiological control of foodborne bacteria and *in situ* on mangaba preservation.

Keywords: packaging, natural antimicrobial agents, fruits.

ÍNDICE DETABELAS

Tabela 1- Porcentagem dos compostos marjoritários de óleos essenciais de <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes.....	38
Tabela 2- Delineamento composto e experimental de formulações de coberturas à base de quitosana com diferentes concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes.	42
Tabela 3- Diâmetros de halo de inibição de bactérias patogênicas para os óleos essenciais de <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes (MYRO) (diâmetro de disco de 6,0 mm).	52
Tabela 4- Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos óleos essenciais <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes 174 e 175 frente a bactérias patogênicas.....	53
Tabela 5- Resultados do delineamento composto central rotacional (DCCR) (1 a 17) para as formulações de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleo essencial MYRO- 174, sendo a variável resposta os diâmetros dos halos de inibição frente a bactérias patogênicas.	56
Tabela 6- Resultados do delineamento composto central rotacional (DCCR) (1 a 17) para as formulações de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleo essencial MYRO- 175, sendo a variável resposta os diâmetros dos halos de inibição frente a bactérias patogênicas.	57
Tabela 7- Coeficientes de determinação (R ²) obtidos na análise estatística para as diferentes bactérias e coberturas comestíveis contendo os óleos MYRO-174 ou MYRO-175.	58
Tabela 8- Análise de variância para atividade antimicrobiana das coberturas de quitosana contendo o óleo MYRO-175 frente ao <i>Bacillus cereus</i>	60
Tabela 9- Análise de variância para <i>Bacillus subtilis</i> – óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes 175.	63
Tabela 10- Análise de variância para <i>Serratia marcescens</i> – óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes 175.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Cobertura comestível (A); Filme comestível de quitosana (B).	19
Figura 2- Mangaba, frutos da mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).	34
Figura 3- Placa de microtitulação	41
Figura 4- Solução de quitosana e fécula de mandioca.....	43
Figura 5- Recobrimento das mangabas	44
Figura 6- Etapas da aplicação de coberturas comestíveis incorporadas com óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes sem mangabas <i>in natura</i> e mangabas contaminadas artificialmente com <i>Bacillus cereus</i>	46
Figura 7- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial MYRO-175 frente ao <i>Bacillus cereus</i>	60
Figura 8- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO-175 frente ao <i>Bacillus cereus</i> em função das concentrações de óleo essencial e quitosana.	61
Figura 9- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes 175 frente ao <i>Bacillus subtilis</i>	63
Figura 10- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO-175 frente ao <i>Bacillus subtilis</i> em função das concentrações de óleo essencial e quitosana.	64
Figura 11- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial MYRO-175 frente à <i>Serratia marcescens</i>	65
Figura 12- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO- 175 frente à <i>Serratia marcescens</i> em função das concentrações de óleo essencial e fécula de mandioca.	66
Figura 13- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO -175 frente à <i>Serratia marcescens</i> em função das concentrações de quitosana e fécula de mandioca.	67

Figura 14- Contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas (A) em mangabas com e sem coberturas comestíveis nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento à temperatura de 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis incorporadas com MYRO-174 e MYRO-175 nos tempos 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento à temperatura de 10°C.....	70
Figura 15- Contagens de bolores e leveduras (A) em mangabas com e sem coberturas comestíveis nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento à temperatura de 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis incorporadas com MYRO-174 e MYRO-175 nos tempos 4, 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento à temperatura de 10°C.....	71
Figura 16- Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (A) em mangabas não revestidas durante 8 dias de estocagem à 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis contendo MYRO-174 ou MYRO-175 durante 12 dias de estocagem à 10°C.	73
Figura 17- Mangabas <i>in natura</i> sem cobertura comestível (controle) no dia 0 (A); Mangabas <i>in natura</i> revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-174 no dia 0 (B); Mangabas <i>in natura</i> revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-175 no dia 0 (C); Mangabas <i>in natura</i> sem cobertura comestível (controle) no 8º dia (D); Mangabas <i>in natura</i> revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-174 no 12º dia (E); Mangabas <i>in natura</i> revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-175 no 12º dia de armazenamento à 10°C (F).	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos.....	25
Quadro 1- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos.....	26
Quadro 2- Aplicação de coberturas comestíveis em frutas.	30
Quadro 3- Dados geográficos dos acessos de plantas de <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS.....	18
3.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.3 APLICAÇÃO DE FILMES OU DE COBERTURAS COMESTÍVEIS EM FRUTAS	27
3.4 APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS EM MANGABAS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAIS	37
4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
4.3 MICRO-ORGANISMOS	39
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO	39
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	40
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	40
4.7 PREPARO DAS FORMULAÇÕES E INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	41
4.8 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS.....	43

4.9 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA <i>IN SITU</i> DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DURANTE A ESTOCAGEM DE MANGABAS	44
4.10 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	47
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	49
5.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS.....	53
5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	58
5.4 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE MANGABAS REVESTIDAS COM COBERTURAS COMESTÍVEIS INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL	68
6. CONCLUSÕES	77
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por alimentos, aliada à recente expansão e reconhecimento do conceito de alimento seguro pela população faz com que, a cada dia, cresça a percepção de risco e a vigilância por parte dos consumidores, da indústria, do varejo e dos governantes (BORGES, 2013). Dentro desta abordagem de controle do risco alimentar, associado ao aumento do tempo de prateleira estão à busca pelo melhoramento da qualidade e as pesquisas de novas embalagens.

Neste contexto, vários pesquisadores têm desenvolvido dentre os vários tipos de embalagens, os chamados revestimentos ou coberturas comestíveis os quais são definidos como uma camada fina de material comestível formada sobre um alimento, geralmente aplicada na forma líquida sobre o produto, por imersão do mesmo (FALGUERA et al., 2011). A função de uma cobertura comestível é atuar como uma barreira à perda de umidade, controlar a respiração e evitar contaminações microbiológicas e químicas. Além disso, podem transportar substâncias antioxidantes, antimicrobianas e flavorizantes, e/ou melhorar a integridade mecânica ou as características de manuseio do alimento. Apresenta, ainda, a vantagem da biodegradabilidade, além de proporcionar economia com materiais de embalagem, manutenção da qualidade, prolongamento da vida útil, aumentando o período de comercialização do alimento (ASSIS; LEONI, 2003; STÜLP et al., 2012).

As matérias-primas empregadas na formação das coberturas e revestimentos comestíveis podem ter origem animal ou vegetal, ou formarem um composto com a combinação de ambas. A quitosana, um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, constituído de repetidas unidades de beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina), tem sido amplamente utilizada nas preparações de coberturas comestíveis devido ao seu comprovado potencial antimicrobiano (ASSIS; BRITTO, 2014).

Substâncias antimicrobianas naturais tais como os óleos essenciais de alecrim-pimenta, orégano, orégano mexicano e pimenta também têm sido incorporadas às coberturas comestíveis com o intuito de aumentar a qualidade e segurança, bem como a vida útil dos alimentos (CRUZ et al. 2012; FERNÁNDEZ-PAN; CARRIÓN-GRANDA; MATÉ, 2014; RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2016).

Quando incorporados nas coberturas os compostos do óleo essencial são liberados ao longo do tempo sobre a superfície do alimento, mantendo o

revestimento ativo durante o período de armazenamento, com isso, podendo aumentar a vida de prateleira do produto (OUATTARA et al., 2000).

O óleo essencial de *M. ovata* Cambessedes, popularmente conhecida como “laranjinha do mato”, tem demonstrado ação larvicida contra o *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2005; LIMA et al., 2011), atividade anti-bacteriana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*, atividade fungicida (CÂNDIDO et al., 2010; SAMPAIO et al., 2016) e anti-inflamatória (SANTOS et al., 2014). Em pesquisas prévias realizadas em sites de buscas de patentes tais como: INPI, Espacenet e WIPO e na literatura científica consultada não foram encontradas patentes ou artigos sobre a elaboração de coberturas comestíveis antimicrobianas de fécula de mandioca e quitosana incorporadas com óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambessedes. Sendo esta a motivação para o desenvolvimento do presente trabalho.

A proposta de desenvolver novas tecnologias para a elaboração de embalagens ativas tais como coberturas comestíveis é de grande valia para o setor industrial, tendo em vista a necessidade crescente de alimentos seguros. Além disto, a proposta de incorporação de óleo essencial nas coberturas tem a finalidade de prolongar a vida de prateleira dos alimentos do ponto de vista microbiológico, visto as propriedades antimicrobianas já bem estudadas de vários tipos de óleos essenciais. O uso de antimicrobianos naturais como alternativa a aditivos químicos em alimentos tem sido cada vez mais exigido por parte dos consumidores. Como consequência, esta proposta abre oportunidades para tecnologias alternativas com futuras aplicações não só em frutas como alimentos diversos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambessedes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais *M. ovata* Cambessedes através da técnica de disco-difusão;
- Selecionar o (s) óleo (s) essencial (is) com maior (es) potencial antimicrobiano frente à maioria das bactérias patogênicas de alimentos;
- Elaborar diferentes formulações de coberturas comestíveis variando-se as concentrações de quitosana, fécula de mandioca e o(s) óleo(s) essencial (is) (com maior potencial antimicrobiano);
- Obter modelos matemáticos para inibição de bactérias patogênicas a partir das formulações de coberturas comestíveis;
- Aplicar coberturas comestíveis (com maior potencial antimicrobiano nos testes *in vitro* em mangabas e avaliar o potencial antimicrobiano durante a estocagem refrigerada.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

A principal finalidade da embalagem é proteger os alimentos contra qualquer tipo de ação de deterioração, sejam elas de natureza química, física ou microbiológica, desde o acondicionamento até o consumo final, assegurando a manutenção de suas próprias características sensoriais, por um período de tempo mais longo, após seu processamento. O tipo de embalagem no qual o produto é acondicionado também pode influenciar na sua vida útil, além de satisfazer as necessidades de marketing tanto da empresa como também do consumidor, custo, disponibilidade entre outros (SOUZA et al., 2012).

A utilização de embalagens de alimentos são estratégias importantes que podem ser decisivas como vantagem competitiva na indústria de alimentos. Portanto, há constante desafio visando atender às exigências dos consumidores, fornecendo embalagens modernas, práticas, que preservem os alimentos e sejam viáveis ambiental e economicamente (SOARES et al., 2009).

Coberturas comestíveis são definidas como uma camada fina de material comestível formada sobre o alimento, geralmente são aplicados na forma líquida sobre o produto, por imersão do mesmo em solução de uma substância geradora formada pela matriz estrutural. Já os filmes comestíveis são películas finas de materiais comestíveis formados separadamente do alimento, e posteriormente aplicadas sobre ou entre os alimentos (Figura 1) (MCHUGH, 2000; FALGUERA et al., 2011).

As vantagens das coberturas comestíveis incluem a diminuição do transporte de gases e de umidade entre os alimentos e o meio, são revestimentos biodegradáveis, apresentam capacidade de transportar aditivos alimentares (antioxidantes e antimicrobianos), podendo ser consumido com alimentos (comestíveis), além de melhorarem a aparência dos produtos e consequentemente sua aceitação por parte dos consumidores (ELSABEE; ABDOL, 2013).

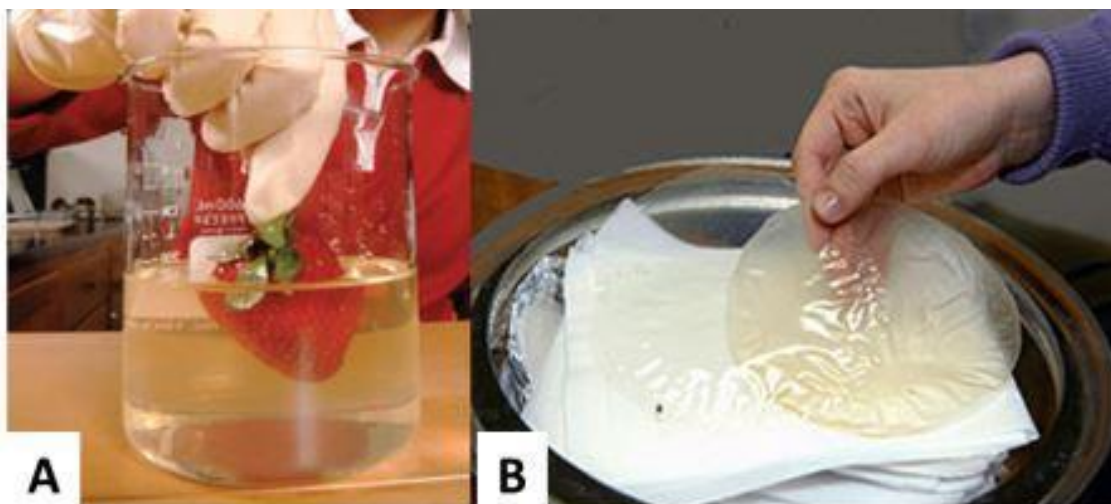


Figura 1- Cobertura comestível (A); Filme comestível de quitosana (B).
Fonte: Netto (2009); Herring e Zhao (2012).

Pesquisas com revestimentos à base de biopolímeros como polissacarídeos, proteínas e materiais lipídicos têm aumentado, devido à habilidade em estender a vida útil do alimento. Além do aumento da vida útil, os revestimentos também podem atuar como agentes de transporte de substâncias ativas, como antimicrobianos, para a superfície do alimento (RIBEIRO et al., 2007; SOARES et al., 2009).

A escolha do material a ser usado na composição dos revestimentos é muito importante, pois as interações entre os componentes do material poderão interferir nas propriedades de barreira, mecânicas e sensoriais dos revestimentos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Os compostos mais utilizados na elaboração de revestimentos comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena), os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação destes compostos. Permite-se assim utilizar vantajosamente as distintas características funcionais de cada classe (LUVIELMO; LAMA, 2012).

A escolha das matérias-primas empregadas na formação das coberturas e revestimentos comestíveis depende fundamentalmente das características do produto a ser revestido e do principal objetivo almejado com o revestimento aplicado (ASSIS; BRITTO, 2014). Os revestimentos a base de polissacarídeos constituem boas barreiras a gases que contribuem para o controle do processo respiratório reduzindo, especialmente, a taxa de escurecimento enzimático, podem contribuir

para uma melhoria no aspecto visual conferindo brilho e transparência, porém existe a desvantagem de serem sensíveis à umidade e apresentarem alta permeabilidade ao vapor de água. Os compostos hidrofóbicos, tais como os lipídeos, são geralmente incorporados em revestimentos com compostos hidrófilos com objetivo de reduzir a permeabilidade ao vapor de água no produto a qual aplicado o revestimento (OLIVEIRA et al., 2007; KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008).

A utilização da fécula de mandioca em revestimentos comestíveis vem se destacando cada vez mais, sendo alternativa recente de conservação pós-colheita para frutos *in natura*, pois esse tipo de polímero é considerado um material com durabilidade em uso e biodegradabilidade. Além de ser abundante no Brasil, incolor, atóxica, comestível, fácil manipulação e baixo custo, quando comparado ao amido de milho e batata (MALI et al., 2002; FALCONE; AGNELLI; FARIA, 2007). Dentre os materiais utilizados em coberturas biodegradáveis, a quitosana tem se destacado por ser facilmente obtida, possuir potencial antimicrobiano, permeabilidade ao oxigênio, biodegradabilidade e caráter não tóxico (LI et al., 2010).

A quitosana é um polímero natural, derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tida como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose (ASSIS; LEONI, 2003). Nas últimas décadas têm sido relatados estudos que mostram o interesse atribuindo a quitosana a partir de suas potencialidades e vantagens como agente antimicrobiano (CHUNG; CHEN, 2008; KONG et al., 2010; CRUZ-ROMERO et al., 2013; GOY; MORAIS; ASSIS, 2016). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não descreve uma legislação específica para embalagens comestíveis. Assim, estes revestimentos são considerados ingredientes, quando melhoram a qualidade nutricional do produto, ou aditivos, quando não incrementam o seu valor nutricional. Devem obedecer ao Decreto 55.871, de 26 de março de 1965; à Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 e à Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1998, referentes ao regulamento sobre aditivos e coadjuvantes de tecnologia e também às considerações do Codex Alimentarius e todas suas atualizações pertinentes (LUVIELMO; LAMAS, 2012). De acordo com o Food and Drug Administration (FDA) alguns óleos essenciais são reconhecidos como GRAS (Substances Generally Recognized as Safe – Substância Geralmente Reconhecida como Segura) (FDA, 2015).

As embalagens ativas vêm sendo aplicadas em diversos países com objetivo de estudar as propriedades antioxidantes e os efeitos antibacterianos, no Brasil o desenvolvimento e a aplicação desse tipo de embalagem ainda está em nível laboratorial, porém algumas já foram desenvolvidas e encontram aplicação em uma ampla variedade de produtos disponíveis no mercado. A definição de legislação pertinente às embalagens ativas é importante para regulamentar o uso dessas tecnologias, bem como para informar ao consumidor sobre sua aplicação segura (SOARES et al., 2009; ATARÉS; CHIRALT, 2016).

A aplicação de coberturas comestíveis em frutas possui grande potencial a ser explorado, principalmente relacionado ao aumento da vida de prateleira pós-colheita, em especial de materiais provenientes de fontes naturais renováveis. É comprovado que o uso de coberturas contribui consideravelmente na manutenção da coloração natural das frutas, na redução da taxa respiratória e perda de massa, além de perdas de compostos com valor nutricional e funcional. Sendo uma alternativa para a conservação de alimentos, podendo substituir as embalagens comerciais ou reduzir o emprego de condições favoráveis de conservação como refrigeração ou atmosferas controladas, reduzindo os custos de preservação e com a vantagem de serem biodegradáveis (ASSIS; LEONI, 2003; ASSIS; BRITTO; FORATO, 2009; LUVIELMO; LAMAS, 2012).

Neste contexto, alguns compostos naturais podem ser utilizados para melhorar a atividade antimicrobiana do revestimento de quitosana, tais como os óleos essenciais, que são uma opção atraente de conservantes naturais (ALVAREZ; PONCE; MOREIRA, 2013). Particularmente, a adição de óleos essenciais na composição de filmes e coberturas comestíveis é mais relevante do que o uso do óleo diretamente nos alimentos, visto que concentrações elevadas podem induzir alterações nas características organolépticas do produto (FERNANDEZ-PAN; CARRIÓN-GRANDA; MATÉ, 2014). Tanto os óleos essenciais como compostos com atividade antioxidante e antimicrobiana podem melhorar as propriedades funcionais dos revestimentos comestíveis e aumentar seu potencial de preservação dos alimentos (BONILLA et al., 2013).

O estudo da aplicação de fécula de mandioca incrementado com óleo essencial é interessante, pois, podem-se analisar as propriedades da combinação polissacarídeo mais óleo essencial para promover melhor barreira à umidade e gases (ORIANI et al., 2014).

Valenzuela et al. (2012) verificaram que revestimentos comestíveis a base de quitosana, proteína de quinoa e óleo de girassol em diversas combinações e concentrações apresentaram que a permeabilidade ao vapor de água foi menor nas coberturas que continham óleo de girassol, devido à natureza apolar dos lipídios, o que melhorou sua interação hidrofóbica.

Estudos tem demonstrado que adição de óleos essenciais em filmes ou coberturas comestíveis de quitosana tem inibido vários tipos de fungos e bactérias patogênicas em vários tipos de alimentos (RUIZ-NAVAJAS et al., 2013; RAMOS-GARCIA, 2012; SEVERINO et al., 2015). Os componentes ideais para a elaboração de coberturas comestíveis utilizadas em frutas são aqueles livres de qualquer substância tóxica, alérgica ou não digerível e que seja de fácil fabricação (ecologicamente) e economicamente viável. Além de fornecer estrutura e estabilidade da superfície contra micro-organismos, boa propriedade de aderência, semipermeabilidade e deve manter ou melhorar a estética e atributos sensoriais do produto, como sabor, coloração, dentre outros (JANJARASSKUL; KROCHTA, 2010).

3.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas naturais complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos e de aparência oleosa a temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. O aroma é agradável e intenso na maioria dos óleos voláteis, são ainda solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso o nome de óleos etéreos (GIORDANI et al., 2008; KNAAK; FIUZA, 2010).

A nomenclatura “óleo essencial” deriva do termo “quinta essência” utilizado por Paracelsus que para se referir ao princípio ativo, presente em drogas e medicamentos, utilizava o termo *quinta essência*. São conhecidos aproximadamente 3.000 tipos de óleos essenciais sendo que 300 possuem importância econômica principalmente no mercado de flavorizantes e essências. É sabido também que tais compostos apresentam atividade antimicrobiana, antivirais, antiparasitárias e inseticidas possivelmente relacionadas com sua função nas plantas (BURT, 2004).

Diferentes métodos de extração são utilizados para isolar óleos essenciais, devendo-se ressaltar que, dependendo do método, a composição do óleo pode variar significativamente. Tais óleos são geralmente extraídos a partir de uma grande variedade de plantas por métodos de destilação, que pode ser simples ou por arraste a vapore extração por fluido supercrítico (CASSEL et al., 2009; NAVARRETE et al., 2011; YUSOFF et al., 2011).

A estrutura química dos óleos essenciais é composta principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (RIZZO; REZENDE, 2009). Componentes de óleos essenciais, como: carvacrol, timol, eugenol, terpineno e carvona têm sido identificados como antimicrobianos (BURT, 2004). Estudos mostram que os óleos essenciais, pertencentes à família *Myrtaceae* tais como: “eucalipto” (*Eucalyptus globulus*), “escova de garrafa” (*Callistemon viminalis*) e “mirta” (*Myrtus communis*) têm demonstrado atividade antimicrobiana frente à micro-organismos, tais como: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens* (SALVAGNINI et al., 2008; PIRES et al., 2013; FURTADO et al., 2015).

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, pode-se ressaltar as interações entre planta e micro-organismos, planta e insetos, planta e planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de colheita, bem como técnicas de colheita e pós-colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (BEZERRA et al., 2008; MORAIS, 2009).

Assim como o teor do óleo essencial nas plantas pode variar consideravelmente de espécie para espécie, em função de parâmetros primários e de fatores agrônômicos como adubação, irrigação, colheita e especialmente, estágio de desenvolvimento da planta a época da colheita. Muitas plantas apresentam mais

de um fenótipo, isto é, diferenças na sua aparência, aroma e sabor. A diversidade qualitativa e quantitativa é geralmente detectada na composição do óleo essencial obtido (KERROLA et al., 1994).

Por apresentarem diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida, atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, fungicida, e atividade antitumoral (CARMO et al., 2008; SILVA et al., 2008; MENDES et al., 2010; RAJKUMA; JEBANESAN, 2010; WANNES et al., 2010), despertam interesse em diversas indústrias (SILVEIRA et al., 2012)

Assim torna-se evidente que o uso dos óleos essenciais tem sido usado amplamente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, além de ser uma alternativa promissora para a elaboração de soluções sanitizantes naturais (HUSSAIN et al., 2008; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

Vários componentes dos óleos essenciais são classificados como GRAS e/ou aditivos alimentares aprovados, porém existe a possibilidade de causarem irritação e toxicidade. Desta maneira, é recomendável que estudos mais seguros antecedam ao emprego amplo dos óleos essenciais, bem como sua concentração ideal nos alimentos aos quais já estão atualmente presentes (BURT, 2004). O grau da toxicidade dependerá da dose utilizada de óleo essencial, na avaliação da toxicidade deve ser levado em conta o efeito cumulativo esinérgico decorrente da sua utilização (DE LA CRUZ, 2002; BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003). A capacidade dos óleos essenciais de inibir o crescimento bacteriano os torna uma interessante alternativa como antimicrobianos naturais na indústria de alimentos. Entretanto, é necessário verificar qual concentração os mesmos devem ser aplicados. Para isso, devem ser realizados testes *in vitro* que determinem a menor concentração que apresente efeito bacteriostático ou inibitório (OLIVEIRA et al., 2011). Ao longo dos anos os pesquisadores têm investigado a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos.

Óleo essencial	Família	Composto químico (majoritário)	Atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	Referência
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> <i>Myrtus communis</i>	<i>Myrtaceae</i>	etanone (25,3%), eucaliptol (13,7%), carifileno (11,5%) e carvacrol (9,0%) Eucaliptol (50,1%), linalol (12,6%),	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P <i>S. aureus</i> ATCC 6538P, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	0,5 - >1% (v.v)	Akin, Aktumsek; Nostro (2010)
<i>Myrcia ovata</i> Cambessedes	<i>Myrtaceae</i>	Geranial (50,4%) e Neral (35,8%)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>E. coli</i> ATCC 25992, <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 e <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.	0,031 – 1% µg/ml	Cândido et al. (2010)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Lamiaceae</i>	1,8 cineole (54,3%) E-miroxide (19,6%)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	4,25 – 12,5 mg/ml	Runyoro et al. (2010)
<i>Origanum vulgare</i> ssp. Hirtum e <i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Lamiaceae</i> , <i>Fabaceae</i> <i>Myrtaceae</i>	Não determinado pelos autores	<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>Salmonella</i> ssp ATCC 10708	0,25 – 0,5 ml/ml 0,5 – 1,0 ml/ml	Santos et al. (2011)
<i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Zingiber officinale</i>	<i>Poaceae</i> <i>Lauraceae</i> <i>Zingiberaceae</i>	Citronela (47,1%) e geraniol (18,5%) (E)-cinnamaldehyde (77,72%) Geranial (25%), Neral (16,4%), 1,8-cineole (10,9%),	<i>E. coli</i> ATCC 11229, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. choleraesuis</i> ATCC 6539. <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442, <i>S. choleraesuis</i> ATCC 6539	31,5 – 25,0 µgml ⁻¹ 7,81 – 15,62 µgml ⁻¹ 7,81 – 62,5 µgml ⁻¹	Andrade et al. (2012)

Quadro 2- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos.

Óleo essencial	Família	Composto químico (majoritário)	Atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	Referência
<i>Lippia origanoides</i>	<i>Verbenaceae</i>	Timol (48,7%) e carvacrol (1,1%)	<i>Staphylococcus sp.</i>	15 – 60 µl/ml	Queiroz et al. (2014)
<i>Laurus nobilis</i>	<i>Lauraceae</i>	1,8 cineole (45,3%) e bornileno (17,2%)	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Salmonella enterica</i>	0,2 – 0,66 mg/ml	Goudjil et al. (2015)
<i>Alpinia guilinensis</i>	<i>Zingiberaceae</i>	α-felandreno (26,7%); 1,8-Cineole(25,8%), L-pineno (15,7%)	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	1,25 – 10,0 mg/ml	Chen et al. (2016)
<i>Sequoia sempervirens</i> (Lamb.)	<i>Cupressaceae</i>	α-felandreno (29,6%); dl-limoneno (15,6%) e α-pineno (8,6%)	<i>S. aureus</i> (RCMB 010027), <i>S. epidermidis</i> (RCMB 010024), <i>Streptococcus pyogenes</i> (RCMB 010015), <i>P. aeruginosa</i> (RCMB 010043), <i>E. coli</i> (RCMB 010056)	4,2 – 7,6 µl/ml	Taha; Shakour (2016)
<i>Coniza bonariensis</i> , <i>Tithonia diversifolia</i> , <i>Ambrosia polystachya</i> , <i>Hedychium coronarium</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>Asteraceae</i> <i>Asteraceae</i> <i>Zingiberaceae</i> <i>Asteraceae</i>	Limoneno (56,7%) β-pineno (38,3%) e α-pineno (18,6%) não composto majoritário β-pineno (46,9%) e α-pineno (19,2%) limoneno (30,9%) e trans-nerolidol (22,4%)	<i>S. aureus</i> ATCC 13565, <i>L. monocytognes</i> ATCC 19117 e <i>S. choleraesuis</i> ATCC6539. <i>S. aureus</i> ATCC 13565 e <i>S. choleraesuis</i> ATCC 6539. <i>S. aureus</i> ATCC 13565 <i>S. aureus</i> ATCC 13565, <i>L. monocytognes</i> ATCC 11229 e <i>E. coli</i> ATCC11229 <i>L. monocytognes</i> ATCC 19117 e <i>S. choleraesuis</i> ATCC 6539	3,9 – 500 µl/ml 15,62 – 2500 µl/ml 125 µl/ml 125 - 250 µl/ml 3,9 - 500 µl/ml	Miranda et al. (2016)

Particularmente, o óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambessedes tem apresentado ação larvicida contra o *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2005; LIMA et al., 2011), atividade bacteriana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*, e bactérias infecciosas da mucosa gástrica e intestinal, além de apresentar atividade fungicida (CÂNDIDO et al., 2010; SAMPAIO et al. 2016) e anti-inflamatória (SANTOS et al., 2014). A *M. ovata* Cambess, popularmente conhecida como laranjinha do mato, é um arbusto de cerca de 8 m de altura, que pertence a Família *Myrtaceae*, apresenta cerca de 140 Gêneros, e aproximadamente 3000 espécies. O gênero *Myrcia* corresponde acerca de 14,6% de todas as espécies vegetais conhecidas desta família. Distribuída principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, as espécies de *Myrtaceae* são amplamente encontradas no Brasil, sendo uma das famílias de árvores dominantes na Mata Atlântica (LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004).

No Estado de Pernambuco a família *Myrtaceae* é representada na Mata Atlântica da planície do Estado por 38 espécies, a maioria, dos gêneros: *Eugenia* e *Myrcia* (AMORIM; ALVES, 2012). Proença et al. (2014) descreve quatro novas espécies da família *Myrtaceae*, com particular relevância para a flora dos Estados de Sergipe e Bahia, dentro dos gêneros de *Eugenia* L. ou *Myrcia* DC. A ocorrência de *Myrcianthes pseudomato* (D.Legrand) McVaugh, a primeira espécie do gênero a ser registrada em Sergipe e a segunda espécie do gênero para Nordeste do Brasil.

Alguns dos constituintes dos óleos essenciais do gênero *Myrcia*, como: flavonóides, triterpenóides, ácidos orgânicos e derivados de acetofenona, têm demonstrado atividades que podem contribuir para propriedades biológicas, no entanto, em todos os casos a influência sinérgica e antagonista dos vários componentes deve ser considerada (CASCAES et al., 2015).

3.3 APLICAÇÃO DE FILMES OU DE COBERTURAS COMESTÍVEIS EM FRUTAS

O uso de revestimentos comestíveis, aplicado em frutas, é uma tecnologia economicamente interessante, uma vez que são utilizadas pequenas quantidades de matérias-primas e muitas destas de baixo valor comercial. Apesar de existir uma grande variedade de revestimentos comestíveis e muitos estudos sobre suas aplicações em frutas, ainda é um campo a ser explorado. Todavia, para desenvolver

esses revestimentos, é necessário considerar suas características mecânicas, físicas e químicas relacionadas ao produto (LUVIELMO; LAMAS, 2012; SITONIO; MENEGALLI, 2012).

O uso de revestimento comestível na conservação de frutas tem sido estudado por pesquisadores, como Souza et al. (2010) verificaram que ao longo de 28 dias, mangas revestidas com cobertura comestível a base do polissacarídeo da goma do cajueiro com diferentes concentrações apresentaram menor perda de massa e não foram observadas variações para os teores de sólidos totais e pH. As coberturas comestíveis com 3% dopolissacarídeo da goma do cajueiro foram as que se mostraram mais eficientes na preservação das características físico-químicas das mangas. Hong et al. (2012) avaliaram os efeitos do revestimento de quitosana sobre as características físico-químicas de goiabas e sugeriram que o revestimento à base de quitosana (3%) pode ser benéfico em retardar o processo de amadurecimento de goiabas armazenadas à 11°C.

Soares et al. (2011) avaliou a conservação pós-colheita de goiaba, onde os frutos foram submetidos a cinco tratamentos: sem revestimento, revestimento de amido de mandioca, revestimento de amido de mandioca com ácido acético e revestimento de amido de mandioca com 1,0% e 1,5% de quitosana. Os autores verificaram que a coloração verde da casca dos frutos tratados com revestimentos contendo 1,0% e 1,5% de quitosana foi mantida, e a coloração da polpa de todos os tratamentos mudou de rósea para vermelho intenso durante o armazenamento; os frutos tratados com revestimento contendo quitosana apresentaram menor perda de massa e os revestimentos antimicrobianos apresentaram menores contagens de fungos filamentosos e leveduras quando comparados ao controle.

Revestimentos comestíveis à base de fécula de mandioca (3%) aplicados em tomate cereja preservaram parâmetros de qualidade como menor acidez e menor atividade de pectinametilesterase (OLIVEIRA; CONEGLIAN; CARMO, 2015).

Fernandes et al. (2015) em estudo com filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado verificaram que as proteínas de soro de leite constituem uma boa alternativa para a produção de filmes biodegradáveis, os quais apresentam-se translúcidos e de coloração amarelada. A aplicação destes filmes em maçãs serviu de barreira para prevenir a perda de umidade.

Em estudo realizado por Vieira et al. (2016) demonstraram que o extrato de Aloe vera pode ser incorporada em revestimentos comestíveis à base de quitosana, de modo a prolongar a vida útil do mirtilo, retardando a sua deterioração.

Partindo do objetivo de melhorar as características funcionais das coberturas alguns pesquisadores (OUSSALAH et al., 2004; ATARÉS et al., 2010; SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2011; PERDONES et al., 2012) têm incorporado substâncias antimicrobianas como os óleos essenciais. Os óleos essenciais tendem a potencializar suas propriedades antifúngicas e antibacterianas quando aplicados associados a revestimentos comestíveis a base de quitosana e fécula de mandioca, assim aumentando a vida útil pós-colheita (VU et al., 2011). No Quadro 2 estão demonstrados diferentes tipos de coberturas comestíveis contendo óleo essencial e suas aplicações em frutas.

Quadro 3- Aplicação de coberturas comestíveis em frutas.

Revestimento	Componente (concentração)	Oleo essencial (concentração)	Aplicação	Referência
Cobertura comestível	Quitosana 8 mg/ml	Limonemo; <i>Oreganum compactum</i> ; <i>Thymus vulgaris</i> ; <i>Mentha piperitae</i> <i>Cymbopogon citrates</i> (0,2%)	Morango	Vu et al. (2011)
Cobertura comestível	Dextrina (20 g/L), cera de carnaúba (20%)	<i>Lippia sidoides</i> (0,25 µL/mL) e <i>Piper aducum</i> (0,25µL/mL)	Manga	Cruz et al. (2012)
Cobertura comestível	Goma xantana (0,5%)	<i>Salvia officinalis</i> L.(0,2%)	Morango	Borges et al. (2013)
Cobertura comestível	Aginato (1,29%)	Erva cidreira (0,3 – 0,5%)	Abacaxi	Azarakhsh et al. (2014)
Cobertura comestível	Fécula de mandioca (1,6%) e quitosana (0,6%).	<i>Lippia gracilis</i> Schauer (106 e 107) (2,4%)	Morango	Azevedo et al. (2014)
Cobertura comestível	Amido (5%)	Hortelã (0,5; 1,0; 1,5%)	Abacaxi	Bitencourt et al. (2014)
Cobertura comestível	Quitosana (0,5% e 1%)	Erva cidreira (0,5% e 1%)	Pimentão	Ali, Noah e Mustafa (2015)
Cobertura comestível	Fécula de mandioca (2%) e quitosana (2%).	Combinação de genótipos de <i>Lippia gracilis</i> Schauer (1,0 – 3,0%)	Goiaba	Aquino; Blank; Santana (2015)
Cobertura comestível	Alginato (1 - 2%)	Eugenol (0,10 - 0,20%) e citral (0,15%) (compostos)	Medronho	Guerreiro et al. (2015)
Cobertura comestível	Pectina	<i>Lippia graveolens</i> (36,1 mg/ml)	Tomate	Rodriguez-Garcia et al. (2016)

Vu et al. (2011) observaram a redução da deterioração fúngica de 80% e 100% em morangos revestidos com cobertura à base quitosana contendo óleos essenciais de limoneno e hortelã-pimenta, respectivamente, após 12 dias de estocagem em 4°C, quando comparado as frutas sem revestimento.

Mangas contaminadas artificialmente com *Lasiodiplodia theobromae* ou *Botryosphaeria dothidea* e revestidas com coberturas à base de dextrina e cera de carnaúba e suas misturas, adicionadas de óleos essenciais de *L. sidoides* e *P. aducum* armazenadas a 10°C por 8 dias e mais 5 dias em temperatura ambiente (25°C) apresentaram menor desenvolvimento de lesões quando comparadas as mangas com diferentes tratamentos e as frutas controles (CRUZ et al., 2012).

Morangos revestidos com coberturas comestíveis à base de goma xantana incorporada com óleo essencial de sálvia, estocados à 4°C durante 12 dias, mostraram menor contagem fúngica até o 5º dia de armazenamento quando comparado as frutas sem revestimento (BORGES et al., 2013).

Azarakhsh et al. (2014) verificaram que abacaxi revestido com filme comestível à base de alginato incorporado com óleo essencial de erva cidreira (0,3% e 0,5%) estocado à temperatura de 10°C por 16 dias apresentaram aumento na contagem total de placas e contagem de bolores e leveduras, porém quando comparados com outros tratamentos e o controle houve uma redução dos microrganismos para a ordem 10⁶ UFC/g.

Azevedo et al. (2014) demonstraram que cobertura comestível à base de quitosana incorporado com 2,4 % de óleo essencial *Lippia gracilis* Schauer foi eficaz na conservação da qualidade microbiológica de morangos em relação a microflora natural, durante o armazenamento a 4°C durante 7 dias.

A eficiência da atividade antimicrobiana de cobertura comestível incorporado com óleo essencial de hortelã (0,5; 1; 1,5%) na conservação de abacaxi minimamente processado foi avaliada por Bitencourt et al. (2014). Os autores observaram, após 6 dias, uma redução de 1 a 1,23 ciclo log para bolores e leveduras, de 1 ciclo log para bactérias psicrófilas e o número de coliformes termotolerantes foi menor que 3NMP/g quando comparado com as frutas controle.

Pimentões revestidos com cobertura comestível à base quitosana (1%) incorporadas com óleo essencial de erva cidreira (0,5%), estocados à temperatura ambiente por 21 dias apresentaram melhor resultado na qualidade dos frutos

quando comparado com o controle e outros tratamentos (1% quitosana; 1% de óleo essencial) (ALI, NOAH E MUSTAFA, 2015).

Aquino; Blank; Santana (2015) verificaram uma redução de bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras durante o acondicionamento à temperatura ambiente (25°C) por 10 dias em goiabas revestidas com cobertura comestível à base de quitosana incorporada com combinação de genótipos de óleos essenciais de *L. gracilis* Schauer (1,0 e 3,0%) quando comparadas às frutas sem revestimento.

Guerreiro et al. (2015) verificaram que a qualidade sensorial e nutricional, bem como a redução microbiana nos medronhos revestidos com coberturas comestíveis a base de alginato (1%) incorporado com composto de óleos essenciais (eugenol = 0,10 - 0,20; citral = 0,15%) foram mantidos a 0,5°C por 28 dias de armazenamento, enquanto que o controle apresentou características menos preservadas.

Rodriguez-Garcia et al. (2016) demonstraram que tomates inoculados com fungo *Alternaria alternatae* revestidos com cobertura comestível à base de pectina e óleo essencial de orégano (36,1 mg/ mL) não apresentaram deterioração fúngica até o final do armazenamento, enquanto que os tomates revestidos com cobertura comestível óleo essencial de orégano (concentrações 15,7 e 25,9 mg/mL) bem como os tomates sem tratamento (controle) apresentaram apodrecimento a partir do 6º dia.

Tendo em vista que a eficiência das coberturas ou filmes comestíveis depende de fatores tais como tipo e concentrações dos componentes utilizados, estudos são necessários para avaliar a influência destes fatores nas propriedades dos revestimentos. Neste contexto o uso de ferramentas como a metodologia de superfície de resposta, é de grande valia para a realização destes estudos. O delineamento composto central rotacional (DCCR) é de característica simétrica e de segunda ordem, que constitui o fatorial (2^k), apresentando um ou mais pontos centrais, e os pontos axiais, tendo a finalidade de reduzir o número de ensaios, obtendo normalmente um erro mínimo nos experimentos. Nesses processos, costuma-se repetir o ponto central, a fim de melhorar as estimativas dos efeitos quadráticos e aumentar os graus de liberdade para o erro, além de muitas vezes requerer poucos ensaios para a sua realização em relação aos fatoriais completos (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

A metodologia de superfície de resposta (MSR), este permite a obtenção de combinações ideais em um sistema multivariável de forma eficiente, contribuindo

ainda para a economia de experimentos, uma vez que tal método exige menos dados experimentais (NWABUEZE, 2010).

A metodologia de superfície de resposta tem sido aplicada para avaliar o efeito dos componentes nas propriedades de filmes ou coberturas comestíveis. Malmiri et al. (2012) avaliaram o efeito de coberturas comestíveis com diferentes concentrações de carboximetilcelulose de sódio (0,1 a 1,5%), caseinato de sódio (0 a 1%) e glicerol (0 a 2%) na qualidade nas características físico-químicas no armazenamento de bananas Berangan revestidas. Os autores observaram que as concentrações ótimas de carboximetilcelulose de sódio, caseinato de sódio e o glicerol para o revestimento de bananas foram de 1,32; 0,40 e 0,86%, respectivamente.

Filmes comestíveis foram desenvolvidos por Fadini et al. (2013) onde foram produziram a partir de colágeno hidrolisado (6,6 a 23,4%), manteiga de cacau (6,64 a 15,4%) e sacarose (11,6 a 28,4%). A composição do filme que proporcionou os melhores resultados, colágeno hidrolisado (15%), manteiga de cacau (4,6%) e sacarose (20%), foi usada para aplicação em chocolate.

Azevedo et al. (2014) elaboraram coberturas comestíveis variando as concentrações de óleo essencial *Lippia gracilis* Schauer (0,6; 1,5; 2,4 e 3,0%) fécula de mandioca (0,4; 1,0; 1,6 e 2,0%) e quitosana (0,6; 1,5; 2,4 e 3,0%) e verificaram a máxima inibição de *S. aureus*, *B. subtilis*, a *S. marcescens* e a *S. enteritidis* pode ser obtida em concentrações de óleo essencial entre 2,8 e 3,0% e quitosana em concentrações entre 0 e 1,0%; 0 e 1,5%; 0 e 1,5% e 0,5 a 2,0%, respectivamente.

Singh; Chatli e Sahoo (2015) desenvolveram filmes comestíveis alternando as concentrações de quitosana (1,5; 2,0 e 2,5%) e glicerol (0,5; 0,75 e 1,0%), bem como a temperatura de secagem (35, 40 e 45°C) e observaram que as condições otimizadas foram: 2,0% de quitosano, 0,75% de glicerol, e temperatura de secagem de 40°C a uma constante de tempo de 48 horas.

Do ponto de vista estatístico, a escolha dos tratamentos pode tornar um delineamento mais eficiente do que outro, na qual pode ser mensurada por meio de alguns critérios de otimização que podem ser implementados em algoritmos de busca. A principal característica da teoria dos delineamentos ótimos está na percepção do delineamento como uma medida de probabilidade com forte ênfase na redução da variância com respeito ao modelo ajustado (LIMA; BUENO FILHO, 2010).

3.4 APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS EM MANGABAS

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera pertencente à família Apocynaceae, nativa do Brasil, cuja área de ocorrência abrange as regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste nas áreas do cerrado e caatinga. A frutificação ocorre normalmente cinco anos após o plantio, entre os meses de outubro e dezembro (PINHEIRO et al., 2001; AVIDOS; FERREIRA, 2003; SOUZA et al., 2007).

A variação na produção de frutos por planta é enorme, sendo que há mangabeiras que podem produzir mais de 800 frutos em um ano. Da mesma forma, o tamanho e o peso dos frutos também apresentam grande variação, sendo que cada fruto possui mais ou menos 5 sementes e pesa cerca de 20 gramas. É uma fruta saborosa e muito nutritiva, ela possui mais vitamina C que a laranja e é uma das frutas mais ricas em ferro e proteína. Os frutos da mangabeira são muito aceitos no mercado, tanto para serem consumidos puros quanto processados (polpas, geleias, sorvetes, sucos, doces, bolos, biscoitos e licores) (LIMA, 2010).



Figura 2- Mangaba, frutos da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Fonte: Lima (2010).

Nas regiões onde ocorrem *H. speciosa*, muitas famílias ganham seu sustento, informalmente, com a coleta e comercialização de seus frutos. O cultivo comercial e o potencial econômico da espécie foram percebidos, despertando assim o interesse de alguns setores representados, por alguns órgãos como a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (EPISTEIN, 2004).

O Estado de Sergipe concentra a maior parte da produção brasileira de mangaba, sendo que 90% dos frutos comercializados nesse Estado provêm das

áreas nativas nas quais populações tradicionais praticam o extrativismo há séculos. Depois de Sergipe, os maiores produtores da fruta são os Estados de Minas Gerais e Bahia (LIMA, 2010). Devido à sua alta incidência na região a mangaba foi reconhecida no Estado de Sergipe como a árvore símbolo do Estado, conforme Decreto Estadual nº 12.723 de 1992 do Governo do Estado de Sergipe, o qual apresenta a preocupação com a proteção das espécies nativas ameaçadas de extinção e o grande significado cultural e econômico para as populações do Estado de Sergipe. Posteriormente, a aprovação da Lei Estadual nº 288 de 2010 reconheceu as catadoras de mangaba como grupo tradicionalmente diferenciado (SOUZA et al., 2015).

Um estudo de caso realizado por Rocha et al. (2015) no povoado Pontal, Indiaroba, Estado de Sergipe, Nordeste brasileiro, destaca-se pela incidência de áreas bem conservadas de mangabeiras, principal recurso para a prática do extrativismo pelas mulheres. Os autores analisaram três conflitos pelo acesso aos recursos para a prática do extrativismo da mangaba: entre catadoras, proprietários e caseiros; entre as catadoras em torno da participação em políticas públicas; e entre as catadoras que residem em diferentes ruas.

A exploração agrícola de mangaba é limitada devido ao seu índice de alta perecibilidade e período de colheita curta, além de seus danos mecânicos, físicos e microbiológicos (SOARES et al., 2012).

Para a comercialização, devem ser coletados frutos “de vez”, que são aqueles que têm uma tonalidade verde amarelada e suportam o transporte e armazenamento. Esses frutos levam de 2 a 3 dias para ficarem maduros, quando podem ser consumidos. Os frutos que estão no chão, também chamados “de queda” ou “de caída”, devem ser usados apenas para consumo imediato (LIMA, 2010).

Os frutos colhidos antes de atingirem completa maturação fisiológica terão o seu processo de amadurecimento prejudicado e consequentemente a qualidade afetada. Enquanto que, a colheita de frutos totalmente maduros reduz sua vida útil e dificulta o seu manuseio e transporte, devido a sua baixa resistência física, causando perdas quantitativas e qualitativas. A colheita deve ser realizada com o fruto ainda na planta, no momento em que se verifique a mudança de tonalidade do verde para o amarelo. Um bom indicativo para o início desse processo é a presença dos primeiros frutos caídos no solo. O amadurecimento dos frutos é atingido em 2 ou 3 dias sob temperatura ambiente. Neste momento, percebe-se o amolecimento de

sua polpa e a produção de um aroma característico (SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2013).

Estudos realizados para avaliar o comportamento de mangabas colhidas em dois estágios, “de caída” e “de vez”, verificaram que as mangabas “de caída” apresentaram durante nove dias de armazenamento, teores de vitamina C e sólidos solúveis superiores aos frutos “de vez”; o armazenamento a 6°C foi eficiente na manutenção das características físico-químicas nos frutos “de vez”, enquanto que para mangabas “de caída” as características físico-químicas foram mantidas por um período de até três dias quando submetidas às temperaturas de 18°C e 25°C (CARNELOSSI, 2004). Enquanto que Silva et al. (2013) observaram que os frutos colhidos “de vez” permanecem aptos para consumo por até 12 dias, quando mantidos a 5°C, e os frutos “de caída” conservam suas características organolépticas por 6 dias, entretanto, com aparência inferior e inapta ao consumo *in natura*.

O extrativismo de mangaba, apesar de beneficiar milhares de famílias e contribuir para conservação da biodiversidade, ainda enfrenta grandes desafios. Um deles é o transporte, quando os frutos, que são delicados, podem ser danificados. Para que ocorra um aumento no consumo de mangaba e que seja expandida a outras regiões, é necessário um incremento no conhecimento de suas características pós-colheita para dinamização do processo de comercialização e armazenamento (LIMA, 2010; SILVA et al., 2013).

Diante do exposto, é de extrema importância o desenvolvimento de novas tecnologias que visem à conservação pós-colheita de mangabas. Plácido et al. (2015) verificaram que mangabas revestidas com filme de pectina armazenadas em temperatura controlada aumentou sua vida útil até o sexto dia de armazenamento. O desenvolvimento científico, tecnológico e da cadeia produtiva da mangaba devem favorecer as comunidades, associados às catadoras de mangabas do Estado de Sergipe quando advindos de atividades de pesquisa ou comércio (SOUZA et al., 2015). É importante enfatizar que não existem, na literatura, pesquisas sobre o desenvolvimento de coberturas comestíveis de quitosana incorporadas com óleos essenciais para conservação de mangabas, sendo o presente estudo pioneiro em avaliar essa tecnologia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A quitosana foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, Ceará). A fécula de mandioca da marca “dinha bá” foi adquirida em supermercado local. As mangabas foram adquiridas em estágio “de vez” no Povoado Caueira, Sergipe. Os meios de cultura foram da marca Himedia e Oxoid, e discos dos antibióticos (gentamicina, cloranfenicol). Ácido acético, dimetilsufóxido e glicerol foram da marca Synth do Brasil.

4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Nove óleos essenciais de plantas de *Myrcia ovata* Cambessedes foram doados pelo Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe. Os óleos foram obtidos de plantas oriundas da cidade de Japaratuba, Sergipe conforme dados geográficos especificados no Quadro 3. A extração dos óleos das folhas foi realizada por hidrodestilação por meio de aparelho do tipo Clevenger. Os óleos foram analisados por Sampaio et al. (2016) no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, através do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050A). Os compostos majoritários obtidos estão apresentados na Tabela 01.

Quadro 4- Dados geográficos dos acessos de plantas de *Myrcia ovata* Cambessedes.

Código da planta	Origem	Dados geográficos	Número do acesso
154	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 38,1"S; 36° 53' 16,8"W	30.876
155.2	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 38,0" S; 36° 53' 17,4" W	33.833
156	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 38,7" S; 36° 53' 19,6" W	30.877
157	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 38,8" S; 36° 53' 19,9" W	33.841
158	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 37,6" S; 36° 53' 18,5" W	35.710
159.1	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 37,2" S; 36° 53' 17,5" W	33.845
173	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 37' 38,5" S; 36° 53' 21,9" W	33.828
174	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 38' 45,4" S; 36° 52' 16,9" W	35.709
175	Japaratuba, Sergipe, Brasil.	10° 38' 44,8" S; 36° 52' 17,7" W	33.827

Tabela 1- Porcentagem dos compostos marjoritários de óleos essenciais de *Myrcia ovata* Cambessedes.

COMPOSIÇÃO (%)									
Composto	MYRO 154	MYRO 155	MYRO 156	MYRO 157	MYRO 158	MYRO 159	MYRO 173	MYRO 174	MYRO 175
1,8-Cineole	-	-	-	-	-	-	33,0	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	19,6	14,9
Isopulegol	-	-	-	-	-	-	-	27,5	-
Iso-isopulegol	-	-	-	-	-	-	-	10,28	-
Neral	28,4	-	-	18,2	-	-	-	-	-
Geraniol	-	-	74,3	-	-	-	-	-	-
Geranial	40,1	-	-	36,9	-	-	-	-	-
Ácido Nerolico	-	67,8	-	-	50,0	73,9	25,6	-	52,6
(E)-Nerolidol	-	-	-	20,2	-	-	-	-	-
(2 Z, 6 E)-Farnesol	-	-	-	-	16,6	-	-	-	-

MYRO: *Myrcia ovata* Cambessedes

4.3 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 00025), *Staphylococcus aureus* (INCQS 00014), *Bacillus cereus* (INCQS 00003), *Bacillus subtilis* (INCQS 00002), *Serratia marcescens* (INCQS 00131), *Escherichia coli* (INCQS 00032), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Salmonella enteritidis* (INCQS 00258) foram doados pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro). As estirpes foram armazenadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) e solução de glicerol a 20% a - 80°C em um Ultrafreezer.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em disco segundo protocolo descrito pelo Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2012). Inicialmente foram preparados os inóculos, cada micro-organismo foi suspenso em 2 mL de Caldo Muller-Hinton formando suspensão de 1×10^8 UFC/mL com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida cada micro-organismo a ser testado foi semeado em placas separadas contendo ágar Muller-Hinton utilizando swabs estéreis, embebidos nas suspensões previamente preparadas. Em cada uma das placas, com o auxílio de uma pinça, foi inserido disco de papel de filtro estéril com 6 mm de diâmetro contendo 15 µL de cada óleo puro. Discos comerciais de gentamicina (30 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, após esse período os halos foram medidos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A sensibilidade das bactérias testadas aos óleos essenciais foi classificada pelo diâmetro dos halos de inibição como segue: (-) não sensível, para diâmetros inferiores a 8 mm; sensível (+) para diâmetros de 9 - 14 mm; muito sensível (+ +) para diâmetros de 15 - 19 mm; e extremamente sensível (+ + +) para diâmetros maiores de 20 mm (DJENANE et al., 2011).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada para 2 óleos essenciais (selecionados dentre os 9 óleos analisados) que apresentaram potencial antibacteriano nos testes de difusão em discos e com maior disponibilidade de acesso.

A determinação da CIM iniciou-se com o preparo das concentrações dos óleos essenciais, que consistiu em: 80µL de óleos essenciais adicionados a 120µL de Caldo Muller- Hilton, acrescido de 0,1% de Mg^{++} , 0,2 % Ca^{++} e DMSO a 1% estéril, obtendo-se a concentração de 400 µL/mL. A partir desta solução, alíquotas de 100µL foram retiradas e adicionadas ao primeiro poço contendo 100µL do meio de cultura, obtendo-se, assim, a concentração de 200µL/mL e, assim, foram feitas diluições sucessivas 100µL/mL; 50µL/mL; 25µL/mL; 12,5µL/mL; 6,25µL/mL; 3,12µL/mL; 1,56µL/mL; 0,78µL/mL; 0,39µL/mL (CLSI, 2012).

Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis contendo 96 poços com fundo em formato U (Figura 3). O procedimento consistiu inicialmente em adicionar nas colunas de 1 a 12 da linha H, 200 µL do meio de cultura Caldo Muller- Hilton para controle negativo e na coluna 11 das linhas de A a G foram colocados 200µL da suspensão de cada cepa microbiana na concentração 10^6 UFC/mL. Na coluna 12 das linhas de A a G, adicionados 200 µL do óleo essencial para controle de esterilidade. Nas colunas de 1 a 10 das linhas de A a G foram adicionados 100µL do meio de cultura Caldo Muller- Hilton acrescido de 0,1% de Mg^{++} , 0,2 % Ca^{++} , DMSO a 1% estéril com o óleo essencial preparados nas diferentes concentrações e 100 µL da suspensão de cada microbiana na concentração de 1×10^6 UFC/mL. As placas foram tampadas e, em seguida, incubadas a 37°C por 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A CIM foi considerada a menor concentração a partir da qual não foi visualizado crescimento microbiano.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram retirados 100µL de amostras e semeados em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton espalhadas com alças de Drigalsky. As placas foram incubadas a temperatura de 36°C por 24 horas.

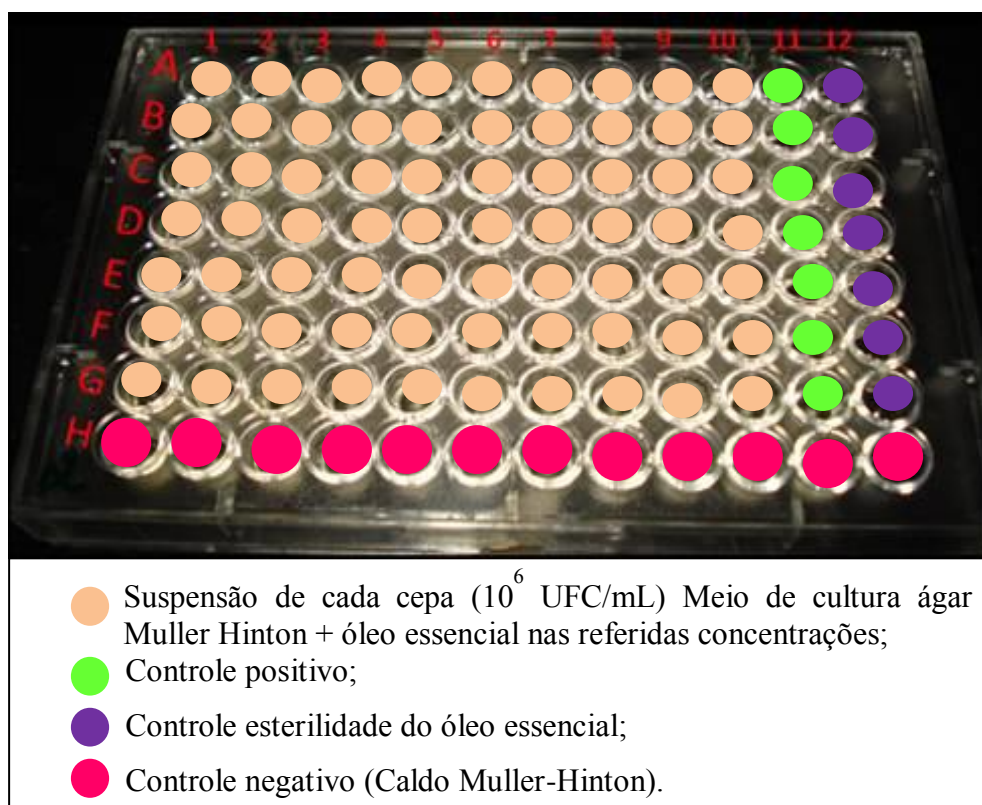


Figura 3- Placa de microtitulação

4.7 PREPARO DAS FORMULAÇÕES E INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

As formulações de coberturas à base quitosana foram elaboradas conforme a patente desta tese de doutorado, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Depósito de Pedido de Patente BR 10 2015 030762 4, constante no ANEXO A. As concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial foram variadas de acordo com o delineamento composto central rotacional 2^3 sendo 6 pontos axiais e 3 centrais totalizando 17 formulações como demonstrado na Tabela 2. Nestes experimentos foram utilizados os 2 óleos essenciais previamente selecionados pelos testes *in vitro* por difusão em discos.

Para cada formulação de cobertura de quitosana preparou-se 200 mL de solução de quitosana, fécula de mandioca e glicerol conforme procedimento a

seguir. Para uma melhor dispersão dos reagentes preparou-se separadamente 100 mL de uma solução de quitosana (massa (g) igual a duas vezes a massa estipulada na Tabela 2), em solução aquosa de ácido acético a 1,5% (p/v) contendo 1,28 g de glicerol. Esta solução foi agitada levemente para evitar-se a formação de bolhas. Em seguida, preparou-se 100 mL de solução de fécula de mandioca (massa (g) igual a duas vezes a massa estipulada na Tabela 2), em solução aquosa contendo glicerol a 0,64% (p/v). A solução de fécula foi aquecida em banho-maria sob agitação, não ultrapassando 70° C, até obter-se a completa gelatinização do amido. Após o resfriamento da solução de fécula de mandioca, esta foi adicionada à solução de quitosana, procedendo-se a completa homogeneização das mesmas. Todas as formulações de cobertura especificadas na Tabela 2 foram preparadas, no mesmo procedimento, de acordo com suas proporções. Em seguida, retirou 5 mL da solução de quitosana + fécula de mandioca, e colocou em frasco para autoclavar a 121°C por 15 min (Figura 4), após esfriar, agitou-se no vortex e acrescentou os volumes de óleo essencial ($\mu\text{L/mL}$ de solução) de acordo com os experimentos.

Tabela 2- Delineamento composto e experimental de formulações de coberturas à base de quitosana com diferentes concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes.

Experimentos	Fécula (% p/v)	Quitosana (% p/v)	Óleo essencial <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes (% v/v)
1	-1 (0,2)	-1 (0,4)	-1 (0,5)
2	+1 (0,8)	-1 (0,4)	-1 (0,5)
3	-1 (0,2)	+1 (1,6)	-1 (0,5)
4	+1 (0,8)	+1 (1,6)	-1 (0,5)
5	-1 (0,2)	-1 (0,4)	+1 (2,0)
6	+1 (0,8)	-1 (0,4)	+1 (2,0)
7	-1 (0,2)	+1 (1,6)	+1 (2,0)
8	+1 (0,8)	+1 (1,6)	+1 (2,0)
9	-1,68 (0)	0 (1,0)	0 (1,25)
10	+1,68 (1)	0 (1,0)	0 (1,25)
11	0 (0,5)	-1,68 (0)	0 (1,25)
12	0 (0,5)	+1,68 (2,0)	0 (1,25)
13	0 (0,5)	0 (1,0)	-1,68 (0)
14	0 (0,5)	0 (1,0)	+1,68 (2,5)
15	0 (0,5)	0 (1,0)	0 (1,25)
16	0 (0,5)	0 (1,0)	0 (1,25)
17	0 (0,5)	0 (1,0)	0 (1,25)



Figura 4- Solução de quitosana e fécula de mandioca.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS

Todas as formulações de coberturas a base de quitosana incorporadas com óleo essencial foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *E.coli*, *E.faecalis* e *S. enteritidis*, através da técnica de Disco-difusão (CLSI, 2012).

Inicialmente foram preparados os inóculos, cada micro-organismo foi suspenso em 2 mL de Caldo Muller-Hinton formando suspensão de 1×10^8 UFC/mL com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida cada micro-organismo a ser testado foi semeado em placas separadas contendo ágar Muller-Hinton utilizando *swabs* estéreis, embebidos nas suspensões previamente preparadas. Em cada uma das placas, com o auxílio de uma pinça, foi inserido disco de papel de filtro estéril com 6 mm de diâmetro contendo 15 μ L de cada solução de quitosana + fécula de mandioca adicionado de óleo essencial de acordo com os experimentos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, após esse período os halos foram medidos. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.9 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA *IN SITU* DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DURANTE A ESTOCAGEM DE MANGABAS

As formulações de coberturas comestíveis que apresentaram maior potencial antimicrobiano nos experimentos *in vitro* (técnica de difusão em disco) foram selecionadas para o revestimento de mangabas e posterior avaliação da qualidade microbiológica das mesmas sob estocagem refrigerada (Figura 5). O efeito antimicrobiano das coberturas foi avaliado em mangabas *in natura* frente à microbiota natural (bactérias aeróbias mesófilas totais, bolores e leveduras) e em mangabas artificialmente contaminadas com *B. cereus*. Esta bactéria foi escolhida para este estudo, por ser uma bactéria patogênica esporulada cujo habitat natural é o solo, podendo também ser encontrada no ar e água. Portanto, frutas como mangabas podem ser facilmente contaminadas por este micro-organismo (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; PAIVA et al. 2009).



Figura 5- Recobrimento das mangabas

Fonte: Arquivo pessoal.

Inicialmente os frutos foram lavados e sanitizados com solução de hipoclorito de Sódio 2,5%, cloreto de Sódio 1,0 % e água deionizada q.s.p. 100% (marca Hidrosteril) (Figura 6A). As mangabas foram separadas em seis lotes (cada lote contendo 100g de frutas), conforme descrito a seguir: a) mangabas sem coberturas comestíveis (controle) (Figura 6B); b) mangabas revestidas com coberturas comestíveis contendo o óleo essencial 1; c) mangabas revestidas com coberturas comestíveis contendo o óleo essencial 2 (Figura 6E); d) mangabas artificialmente contaminadas com *B. cereus* e sem revestimento (controle) (Figura 6G); e) mangabas artificialmente contaminadas com *B. cereus* e revestidas com coberturas comestíveis contendo o óleo essencial 1; f) mangabas artificialmente contaminadas com *B. cereus* e revestidas com coberturas comestíveis contendo o óleo essencial 2 (Figura 6I).

As coberturas comestíveis selecionadas foram preparadas conforme o item 4.7. Para o revestimento de mangabas *in natura*, lotes de 100 g dos frutos foram mergulhados nas soluções de coberturas comestíveis e mantidos por 15 min (Figura 6C), em seguida foram colocados sobre telas na câmara de fluxo laminar para secagem durante 30 min em temperatura ambiente (Figura 6D). Outro lote dos frutos (100g) foi colocado em uma suspensão da bactéria em caldo Muller-Hinton na concentração de 1×10^6 UFC/mL e mantidos por 15 min (Figura 6F). Previamente as mangabas foram analisadas para verificar se havia a presença do patógeno. A seguir as mangabas foram revestidas com as coberturas comestíveis conforme descrito anteriormente para as mangabas *in natura* (Figura 6H). Os frutos foram armazenados em câmara BOD em temperatura de 10°C durante 12 dias. A cada 48 h de incubação um lote foi removido para análise da microbiota natural (bactérias aeróbias mesófilas totais; bolores e leveduras) e contagem de *B. cereus* (Figura 6J).

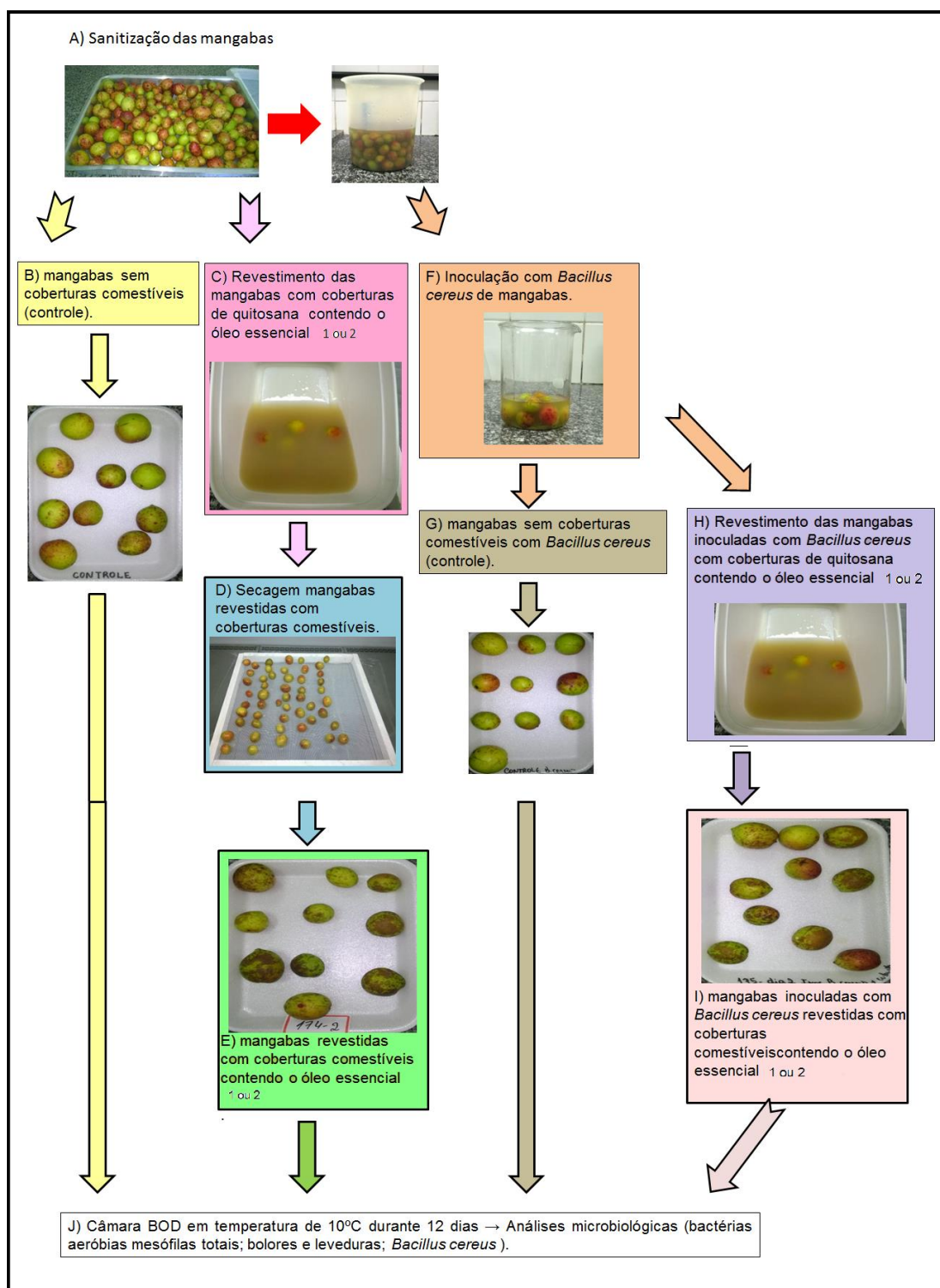


Figura 6- Etapas da aplicação de coberturas comestíveis incorporadas com óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessede sem mangabas *in natura* e mangabas contaminadas artificialmente com *Bacillus cereus*.

4.10 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Cada lote de mangabas (100 g) com e sem coberturas comestíveis foi analisado quanto à microbiota natural ou contagem de *B. cereus* a cada 48h de estocagem refrigerada. Para análise da microbiota natural realizou-se a contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais, bolores e leveduras de acordo com as metodologias descritas na Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle de produtos de origem animal e água e a Norma ISO 7932:2004 (BRASIL, 2003). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As frutas foram transferidas para 900 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Em seguida homogeneizou-se a amostra sob agitação durante 15 min, obtendo-se a diluição inicial (10^{-1}) a partir da qual fez-se as demais diluições (10^{-2} e 10^{-3}).

Para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais utilizou-se a técnica de semeadura em profundidade, onde semeou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis e adicionou-se cerca de 20 mL de ágar PCA (Ágar Padrão para Contagem) fundido e resfriado a 45°C. O ágar com o inóculo foi adequadamente homogeneizado e as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A seguir, procedeu-se a contagem das colônias e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por 100 gramas das frutas (UFC g^{-1}).

A contagem de bolores e leveduras foi realizada pela técnica de semeadura em superfície. Alíquotas de 0,1mL foram semeadas na superfície do Ágar Batata Dextrose e com o auxílio de alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. Em seguida as placas foram incubadas a 25°C por 5 a 7 dias. Os resultados foram expressos em UFC g^{-1} .

Para contagem de *B. cereus*, alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar MYP (Polimixina gema de ovo). As placas foram incubadas a 30°C por 24/48 horas. Para confirmação das colônias típicas (colônias rodeadas por um halo de precipitação opaco sobre um fundo róseo), selecionou-se 3 a 5 colônias típicas e semeou-as em tubos com ágar BHI (Brain Heart Infusion) inclinado a 30°C por 24 horas. O inóculo (mix de até seis colônias típicas) foi transferido para um ponto único em uma placa de ágar sangue,

por simples contato. Em seguida incubou-se a 30°C por 24 horas e observou se houve a formação de um halo claro de hemólise em redor das colônias (teste positivo).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao Teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando-se o programa estatístico Assistat beta (7.7). Os resultados do DCCR foram analisados estatisticamente através do Programa STATISTIC 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os diâmetros dos halos de inibição das bactérias patogênicas obtidos para os óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes (MYRO) estão apresentados na Tabela 3. Todos os óleos essenciais MYRO apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus*; *B. cereus*; *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, com diâmetros dos halos de inibição entre 10 e 32 mm.

A bactéria *S. aureus* apresentou sensibilidade a todos os óleos essenciais MYRO, com halos de inibição entre 11,0 – 28,5 mm, assim como *B. cereus* (entre 10,0 – 17,0 mm), *B. subtilis* (entre 13,5 – 30,0 mm) e *P. aeruginosa* (entre 11,0 – 32,0 mm). De acordo com Djenane et al. (2011) essas bactérias são consideradas extremamente sensíveis a esses óleos essenciais, pois apresentaram diâmetros dos halos de inibição superiores a 20 mm. O *E. faecalis* apresentou sensibilidade a todos os óleos essenciais, com exceção ao MYRO 159 (halo de inibição = 7,5 mm) sendo classificado como não sensível para esse óleo essencial por apresentar diâmetros dos halos de inibição iguais ou menores a 8 mm. A *S. marcescens* e *E. coli* foram sensíveis (diâmetros dos halos de inibição entre 9 e 14 mm) apenas aos óleos essenciais MYRO- 175 (halo de inibição = 11,0 mm), 157 (halo de inibição = 9,5 mm), respectivamente. *S. enteritidis* não foi sensível aos óleos essenciais MYRO- 158, 173 e 175, pois apresentaram diâmetros dos halos de inibição iguais ou menores a 8 mm.

No estudo realizado por Cândido et al. (2010), o óleo essencial *M. ovata* (oriundo do Ceará) também demonstrou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. faecalis*, com halos de inibição entre 16 – 36 mm, sendo a bactéria *E. faecalis* a que demonstrou maior sensibilidade ao óleo essencial.

Akin; Aktumsek; Nostro (2010) avaliaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais *Eucalyptus camaldulensis* e *Myrtus communis*, ambos da Família Myrtaceae, e verificaram que o óleo essencial *M. communis* apresentou atividade antibacteriana contra micro-organismos Gram-positivos (*S. aureus*) e Gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*) com halos de inibição 15 mm; 15 mm e 7 mm,

respectivamente. Confirmando este resultado Jafri; Husaim e Ahmad (2014) observaram atividade antibacteriana do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, da Família Myrtaceae frente às diferentes estirpes de *S. aureus*. Os diâmetros dos halos de inibição mostraram valores entre 10 - 18 mm. Mota; Turrini e Poveda (2015) constataram que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* apontou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*; *Proteus vulgaris*; *E. coli* e *Candida albicans* com halos de inibição entre 3 – 9 cm.

Os óleos essenciais extraídos de plantas de *M. ovata* Cambessedes coletados no Estado de Sergipe apresentaram alta variabilidade de compostos químicos dentro da espécie e devido a este fato também foi observado diferentes atividades antimicrobianas frente às bactérias patogênicas de alimentos. Segundo Sampaio et al. (2016) apesar das plantas estarem localizadas muito próximas umas das outras, sendo submetidas a condições ambientais comuns, como o solo e luminosidade, os fatores genéticos seriam o principal motivo para as diferenças na composição química e conseqüentemente na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das mesmas.

Os resultados demonstraram que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis à maioria dos óleos essenciais do que as Gram-negativas. Uma possível explicação para a menor susceptibilidade dos micro-organismos Gram-negativos é a presença da membrana externa que restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos por meio dos lipopolissacarídeos (BURT, 2004). Devido a maior disponibilidade dos óleos MYRO-174 e MYRO-175 e sendo as bactérias Gram-positivas de muito sensíveis a extremamente sensíveis aos mesmos, estes foram selecionados para a incorporação nas coberturas comestíveis a base de quitosana. O isopulegol e ácido nelórico foram os compostos majoritários dos óleos essenciais MYRO-174 e MYRO-175, respectivamente. Os óleos essenciais com conteúdos maiores de monoterpenos demonstram ser mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano (MIRANDA et al., 2016). O isopulegol é monoterpeno alcóolico presente nos óleos essenciais de várias plantas de uso terapêutico conhecido por apresentar propriedades ansiolíticas e anticonvulsivas (SILVA et al., 2007; CEBORSKA; SZWED; SUWINSKA, 2013). Foi aprovado pelo FDA como flavorizante, apresenta baixa toxicidade dérmica e oral, com isso é utilizado na indústria de cosméticos (shampoo e sabonetes) e na indústria de alimentos como aromatizantes (sorvete e doces) (JIROVETZ et al., 2007; BHATIA et al., 2008). Alves et al. (2016) avaliaram o

potencial antifúngico dos compostos químicos (majoritários por grupo) do óleo essencial extraído da planta de *Myrcia lundiana* Kiaersk frente a *Lasiodiplodia theobromae*. Os autores verificaram que nos Grupos I (ácido nerólico; 1,8 cineole), II (neral; geranial) e III (isopulegol; iso-isopulegol) houve inibição do crescimento micelial de *L. theobromae* em todas as concentrações testadas. Sampaio et al. (2016) realizaram o primeiro relato de identificação do ácido nerólico no óleo essencial de plantas de *M. ovata*.

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para os óleos MYRO-174 e MYRO-175 e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Os menores valores de CIM (0,78 µL/mL) do óleo MYRO-174 foram obtidos frente ao *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, seguido do *B. cereus* (CIM= 3,12 µL/mL), *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* (CIM= 6,25 µL/mL), *S. marcescens* e *E. faecalis* (CIM=12,5 µL/mL). Já para o MYRO-175 o menor valor de CIM (0,78 µL/mL) foi obtido frente a *P. aeruginosa*, seguido do *B. subtilis* (CIM = 6,25 µL/mL), *B. cereus* e *S. enteritidis* (CIM = 12,5 µL/mL).

Os óleos essenciais apresentaram efeito bactericida frente a todas as bactérias com valores variando entre 6,25 µL/mL e 100 µL/mL. Particularmente a *P. aeruginosa* (Gram-negativa), a qual comumente apresenta pouca sensibilidade a óleos essenciais (ARAÚJO et al., 2013; BATISTA et al., 2014), pôde ser eliminada com 6,25 µL/mL do óleo MYRO-174.

Tabela 3- Diâmetros de halo de inibição de bactérias patogênicas para os óleos essenciais de *Myrcia ovata* Cambessedes (MYRO) (diâmetro de disco de 6,0 mm).

Bactérias	Diâmetros de halo de inibição (mm)										
	Antibióticos		Óleos essenciais								
	GEN	CLO	MYRO-154	MYRO-155.2	MYRO-156	MYRO-157	MYRO-158	MYRO-159.1	MYRO-173	MYRO-174	MYRO-175
<i>S. aureus</i>	26,5±4,9	27,5±3,5	28,5±1,2	13,0±1,5	16,0±1,0	20,0±2,0	11,5±0,5	12,5±0,5	11,0±0,0	14,0±2,5	12,5±0,7
<i>B. cereus</i>	24,0±11,3	25,5±0,7	13,5±0,5	10,0±0,8	13,0±0,8	20,0±0,0	16,5±0,9	15,0±1,4	17,0±1,0	15,5±0,7	15,0±1,4
<i>B. subtilis</i>	25,0±0,0	24,0±0,0	25,0±2,0	16,0±0,0	17,0±2,0	30,0±2,5	13,5±0,5	17,5±1,5	16,5±0,7	20,0±1,4	18,5±2,0
<i>E. faecalis</i>	22,0±	20,0±0,0	20,0±0,0	8,5±0,5	13,0±0,8	17,0±2,0	8,5±0,5	7,5±0,5	12,5±0,7	10,5±0,7	22,0±1,4
<i>P. aeruginosa</i>	8,0±2,8	10,5±6,4	11,0±0,0	16,5±0,5	16,5±1,2	30,0±0,9	13,0±0,5	15,5±0,5	19,0±1,4	32,0±2,5	17,5±0,7
<i>S. marcescens</i>	17,0±4,2	27,0±2,8	8,0±0,2	7,0±0,0	8,0±0,4	7,6±0,2	7,0±0,0	7,0±0,2	7,5±0,5	6,0±0,0	11,0±1,4
<i>E. coli</i>	8,5±3,5	24,0±1,4	10,5±12	10,0±0,0	8,0±0,0	9,5±0,5	8,5±0,5	8,6±0,5	8,0±0,0	8,0±0,5	8,0±0,0
<i>S. enteritidis</i>	26,5±4,9	14,5±12	13,0±0,8	9,5±1,2	9,6±0,5	10,5±0,5	8,0±0,0	8,5 ±0,5	7,5±0,5	13,0±3,0	6,0±0,0

GEN= gentamicina
CLO = cloranfenicol

Tabela 4- Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos óleos essenciais *Myrcia ovata* Cambessedes 174 e 175 frente a bactérias patogênicas.

Micro-organismos	MYRO-174		MYRO-175	
	CIM ($\mu\text{L/ml}$)	CBM ($\mu\text{L/ml}$)	CIM ($\mu\text{L/ml}$)	CBM ($\mu\text{L/ml}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,78	6,25	0,78	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25	25	25	25
<i>Bacillus cereus</i>	3,12	25	12,5	25
<i>Bacillus subtilis</i>	0,78	12,5	6,25	25
<i>Serratia marcescens</i>	12,5	25	25	25
<i>Escherichia coli</i>	6,25	25	25	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	12,5	25	25	50
<i>Salmonella enteritidis</i>	6,25	25	12,5	25

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS

A atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis contendo os óleos MYRO-174 e MYRO-175 foi analisada frente a bactérias patogênicas, utilizando o método de difusão em disco e os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os diâmetros dos halos de inibição variaram entre 9,0 e 12,5 mm.

As bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *B. subtilis* foram sensíveis a todas as formulações (diâmetros entre 9,0 e 10,0 mm; 9,0 e 11,2 mm; respectivamente de coberturas comestíveis com óleo essencial de MYRO-174. Em relação às formulações de coberturas comestíveis incorporadas com óleo essencial de MYRO-175, o *B. cereus* mostrou-se sensível às formulações com 1% de fécula de mandioca, 1% de quitosana e 1,25 de óleo essencial (formulação 10), 0,5% de fécula de mandioca, 1 a 2% de quitosana e 0 a 2,5% de óleo essencial (formulações 12 a 17) com diâmetros dos halos de inibição entre 9,0 e 10,0 mm. Já o *B. subtilis* mostrou-se sensível às formulações com 0,2 a 1% de fécula de mandioca, 0,4 – 1,6% de quitosana e 0,5 a 2% de óleo essencial (formulações 3 a 10), 0,5% de

fécua de mandioca, 1% de quitosana e 0 – 2,5 de óleo essencial (formulações 13 a 17), com diâmetros dos halos de inibição entre 9 e 12,5 mm.

Azevedo et al. (2014) observaram que o *B. cereus* e *B. subtilis* mostraram-se sensíveis apenas as formulações com 0,6 - 1,5% de quitosana; 2,4 – 3% óleos essenciais *Lipia gracillis* Schauer (106 ou 107) e 1,5% de quitosana; 3% óleo essencial *Lipia gracillis* Schauer (106), respectivamente. Assim, pode-se verificar que o *B. cereus* e *B. Subtilis* foram sensíveis a concentrações de óleos essenciais mais elevadas quando comparadas as concentrações utilizadas no presente estudo.

O *S. aureus* mostrou-se sensível às formulações 3 e de 6 a 17 (diâmetros entre 9,3 e 10 mm) de coberturas comestíveis com óleo essencial de MYRO-174 e a todas as formulações (diâmetros entre 9,0 e 10,6 mm) de coberturas comestíveis com óleo essencial MYRO-175. O *E. faecalis* demonstrou sensibilidade apenas as coberturas comestíveis com óleo essencial MYRO-174, as quais continham 0,5% de fécula de mandioca, 1% de quitosana e 0 – 2,5% de óleo essencial (formulações 13 e 14) com diâmetros dos halos de inibição de 9 mm.

Neste trabalho, o *S. aureus* foi sensível à maioria das formulações de quitosana incorporadas com o óleo de *M. ovata* Cambessedes. Resultado oposto foi obtido por Azevedo et al. (2014) onde esta bactéria foi sensível apenas às coberturas comestíveis à base de quitosana e fécula de mandioca que continham 2,4% óleo essencial do óleo *L. gracillis* Schauer 106 e a bactéria *E. faecalis* não apresentou sensibilidade a nenhuma das formulações de coberturas comestíveis.

Aquino; Blank e Santana (2015) verificaram que coberturas comestíveis a base de quitosana (2%) e fécula de mandioca (2%), adicionadas com 1,5% de misturas de diferentes genótipos de óleo essenciais de *L. gracilis* Schauer apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e ao *B. cereus* com diâmetro dos halos de inibição entre 9,0 e 14 mm. Por outro lado, *B. subtilis* foi sensível a diferentes formulações das coberturas comestíveis com variação da quitosana (1 a 2 %), fécula de mandioca (2%) e mistura óleos essenciais (2 a 3%).

Dentre as bactérias Gram-negativas a *P. aeruginosa* foi a que se mostrou mais sensível às formulações com MYRO-174 (formulação 2: 0,8% de fécula de mandioca, 0,4% de quitosana e 0,5% de óleo essencial; formulação 3: 0,2% de fécula de mandioca, 1,6% de quitosana e 0,5 de óleo essencial e formulações de 5 a 17: 0 a 1% de fécula de mandioca, 0 a 2% de quitosana e 0 a 2,5% de óleo essencial). Esta bactéria foi sensível a todas as formulações com MYRO-175 (exceto

a formulação 11), com diâmetros dos halos de inibição entre 9,0 e 10,5 mm. Aquino; Blank e Santana (2015) têm obtido resultados próximos a este trabalho, diâmetros de halos de inibição entre 9,3 – 11,8 mm com coberturas comestíveis a base de quitosana (2%), féculade mandioca (2%), adicionadas com misturas de diferentes genótipos de óleo essenciais de *L. gracilis* Schauer (2 – 3%) frente a *P. aeruginosa*.

As bactérias *E. coli* e *S. enteritidis* não foram sensíveis a nenhuma das coberturas comestíveis com ambos os óleos. Do mesmo modo *S. marcescens* não foi sensível às coberturas comestíveis com óleo essencial MYRO-174, sendo os diâmetros dos halos de inibição entre 6,0 e 8,7 mm. Azevedo et al. (2014) também obtiveram resultados similares, visto que dentre os micro-organismos Gram-negativos a *S. marcescens* apresentou-se sensível apenas a uma formulação de cobertura comestível a base de quitosana incorporada com óleo essencial de *L. gracilis* Schauer, e as demais bactérias: *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa* não demonstraram sensibilidade a nenhuma das formulações.

Por outro lado, Aquino; Blank e Santana (2015) obtiveram resultados opostos ao presente estudo, os autores verificaram que as bactérias Gram-negativas *E. coli* (halos de inibição entre 9,1 e 9,3 mm), *S. marcescens* (halos de inibição entre 9,3 e 9,6 mm), *S. enteritidis* (halos de inibição entre 9,0 e 11,0 mm) e *P. aeruginosa* (halos de inibição entre 9,3 e 11,8 mm) foram sensíveis às formulações de coberturas comestíveis a base de quitosana (em concentrações entre 0,5% e 2,0%) incorporadas com a mistura de 2 genótipos do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer (em concentrações entre 1,0% e 3,0%).

Essas diferenças de atividade antimicrobiana entre as coberturas comestíveis contendo o óleo *Myrcia ovata* Cambessedes ou o óleo *Lippia gracilis* Schauer sozinho ou em combinação se deve aos diferentes componentes químicos presentes nos óleos, bem como ao efeito sinérgico entre estes compostos e sua interação com os demais componentes das coberturas (quitosana e fécula de mandioca).

Contudo, estes resultados são inéditos visto que não há registros na literatura sobre o estudo da atividade antimicrobiana de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes frente a bactérias patogênicas de alimentos.

Tabela 5- Resultados do delineamento composto central rotacional (DCCR) (1 a 17) para as formulações de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleo essencial MYRO- 174, sendo a variável resposta os diâmetros dos halos de inibição frente a bactérias patogênicas.

Exp.	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. enteritidis</i>
1	9,4 ±0,5	9,2 ±0,9	7,5 ±0,3	8,0±0,0	8,7 ±0,8	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	6,0 ±0,0
2	9,0 ±0,0	9,0 ±0,0	8,0 ±0,3	8,0 ±0,0	9,2 ± 0,5	6,0 ±0,0	7,5 ±0,7	6,0 ±0,0
3	10,0 ±0,0	9,4 ±0,5	9,5 ±0,5	6,0 ±0,0	9,0 ±0,4	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0	6,0 ±0,0
4	9,0 ±0,6	9,3 ±0,5	8,5 ±0,5	6,0 ±0,0	8,3 ±0,3	6,0 ±0,0	7,0 ±0,0	6,0 ±0,0
5	9,0 ±0,2	9,4 ±0,2	7,5 ±0,2	8,0 ±0,6	10,0 ±0,0	7,5 ±0,4	7,5 ±0,0	8,0 ±1,0
6	9,5±0,7	10,0 ±0,0	9,5 ±0,2	8,0 ± 1,7	10,3 ±0,6	8,7 ±0,5	8,0 ±0,0	8,0 ±1,0
7	10,0 ±0,0	9,6 ±0,3	9,3 ±0,5	7,0 ±0,6	9,3 ±0,6	8,7 ±0,5	8,0 ±0,0	7,0 ±0,0
8	9,5±0,6	10,3 ±1,2	10,0 ±0,6	6,0 ±1,0	10,3 ±0,6	8,0 ±0,0	7,0 ±0,7	8,0 ±0,0
9	10,0 ±1,0	10,0 ±0,4	9,3 ±0,3	8,0 ±0,6	9,2 ±0,2	8,0 ±0,0	7,5 ±0,7	7,5 ±0,7
10	10,0 ±0,5	9,5 ±0,9	9,3 ±0,6	7,0 ±0,6	8,8±0,4	7,6 ±0,0	7,5 ±0,7	7,5 ±0,7
11	9,0 ±0,0	11,3 ±0,3	10,0 ±0,5	8,0 ±0,3	9,3 ±0,6	7,6 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0
12	9,5±0,7	9,2 ±0,3	10,0 ±0,2	8,5 ±0,0	9,3 ±0,3	8,3 ±0,3	8,0 ±0,0	7,5 ±0,7
13	9,0 ±1,0	9,5 ±0,7	9,3 ±0,4	9,0 ±0,2	9,4±0,5	8,2 ±0,3	8,0 ±0,0	8,0 ±0,0
14	10 ±0,4	11,2 ±0,2	10,0 ±0,0	9,0 ±0,0	9,7 ±0,5	7,6±0,0	8,0 ±0,0	7,0 ±0,0
15	9,5 ±0,0	9,5 ±0,3	9,5 ±0,2	7,0 ±0,0	9,0 ±0,4	7,3 ±0,0	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0
16	9,0 ±0,0	10,0 ±0,7	9,2 ±0,2	8,0 ±0,3	9,6±0,6	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0
17	10,0 ±0,0	10,0 ±0,6	10,0 ±0,4	7,5 ±0,0	9,4 ±0,3	7,2 ±0,2	8,0 ±0,0	6,0 ±0,0

Tabela 6- Resultados do delineamento composto central rotacional (DCCR) (1 a 17) para as formulações de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleo essencial MYRO- 175, sendo a variável resposta os diâmetros dos halos de inibição frente a bactérias patogênicas.

Exp.	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. enteritidis</i>
1	6,0 ±0,0	8,0 ±0,0	9,0 ±0,0	6,0 ±0,0	9,0 ±0,0	6,0 ± 0,0	6,0 ±0,0	7,0 ±0,0
2	6,0 ±0,0	8,0 ±0,0	9,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,0±0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0
3	10,0 ±0,0	10,0±0,7	9,0 ±0,0	7,0±0,0	10,0 ±0,0	8,0 ±0,0	8,0 ±0,0	8,0 ±0,0
4	10,0 ±0,0	9,0 ±0,0	10,0 ±0,0,	8,5 ±0,0	10,0 ±0,0	7,5 ±0,7	9,0 ±0,0	8,0 ±0,0
5	9,7 ±0,6	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0
6	9,0 ±0,0	10,0 ±0,0	9,0 ±0,0	8,0 ±0,0	10,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0
7	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	6,0 ±00	11,0 ±1,0	7,0 ±0,0	8,0±0,0	7,0 ±0,0
8	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	11,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,0 ±0,0	6,5 ±0,7	9,0 ±1,0	8,5 ±0,5
9	9,3 ±0,6	9,0±0,0	9,0 ±0,0	7,0 ±0,0	10,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0
10	9,0 ±0,0	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,5 ±0,0	7,5 ±0,7	9,0 ±0,0	8,0 ±0,0
11	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,6 ±0,0	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0	7,0 ±0,0	7,0 ±0,0	8,5 ±0,5
12	10,0 ±0,0	8,0 ±0,0	10,6 ±0,0	7,0 ±0,0	9,5 ±1,0	7,5 ±0,7	8,0 ±0,0	6,5 ±0,7
13	9,3 ±0,6	10,0 ±0,0	10,3 ±0,0	6,0 ±0,0	10 ±0,0	6,0 ±0,0	7,0 ±0,0	8,0 ±0,0
14	10,3 ±0,6	12,5 ±0,7	10,3 ±0,0	8,5 ±0,5	9,5 ±0,0	8,0 ±0,0	8,0 ±0,0	8,0 ±0,0
15	10,0 ±0,0	11,5 ±0,0	10,3 ±0,0	8,0 ±0,0	10,0 ±0,0	7,0 ±0,0	9,0 ±0,0	7,0 ±0,0
16	10,0 ±0,0	12,0 ±1,1	10,3 ±0,0	8,5 ±0,5	10,0 ±0,0	7,5 ±0,7	10,0 ±0,0	8,0 ±0,0
17	11,0 ±0,0	10,5 ±1,0	9,6 ±0,0	8,0 ±0,0	10,5 ±0,5	7,0 ±0,0	10,0±0,0	7,0 ±0,0

5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Os resultados do DCCR (Tabelas 8 e 9) foram analisados através do Programa STATISTIC 8.0 com o objetivo de avaliar a influência das concentrações de quitosana, fécula de mandioca e óleo essencial na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis. Os coeficientes de determinação (R^2) para os efeitos estimados dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas estão demonstrados na Tabela 7. Este coeficiente é uma medida de ajustamento de um modelo, em relação aos valores observados. O R^2 varia entre 0 e 1, indicando, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto maior o R^2 , mais explicativo é modelo, melhor ele se ajusta à amostra (IEMMA; RODRIGUES, 2009). Diante do exposto, verificou-se que foi possível a geração de modelos estatísticos apenas para as bactérias *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. marcescens* com as coberturas contendo MYRO-175 (ao nível de 90% de significância). Para os demais casos, o baixo coeficiente de determinação pode ser devido ao fato de não ter ocorrido diferenças de atividade antimicrobiana entre as formulações.

Tabela 7- Coeficientes de determinação (R^2) obtidos na análise estatística para as diferentes bactérias e coberturas comestíveis contendo os óleos MYRO-174 ou MYRO-175.

Micro-organismos	Coeficiente de determinação (R^2) (ao nível de 95% de significância)	
	MYRO- 174	MYRO- 175
<i>Bacillus cereus</i>	0,70	0,94*
<i>Bacillus subtilis</i>	0,47	0,94*
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,60	0,78
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,41	0,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,60	0,77
<i>Escherichia coli</i>	0,65	0,82
<i>Serratia marcescens</i>	0,48	0,91*
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,41	0,50

*Análise estatística ao nível de 90% de significância

5.3.1. Análise estatística para o *B. cereus*

O gráfico de pareto da Figura 7 demonstrou que as variáveis independentes: quitosana (linear) e (quadrática), óleo essencial MYRO-175 (linear), bem como as interações entre quitosana e óleo essencial apresentaram resultados estatisticamente significativos (valores à direita da linha vermelha pontilhada verticalmente). A quitosana (linear) e o óleo essencial MYRO-175 (linear) demonstraram efeito positivo, isto é, quanto maiores os valores destes parâmetros, maior será a atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis (halos de inibição) frente ao *B. cereus* ao nível de 90% de significância ($p < 0,1$), sendo a quitosana o parâmetro que mais influenciou. Já os parâmetros quitosana (quadrático) e a interação entre a quitosana e o óleo essencial demonstraram efeito negativo, ou seja, valores menores irão proporcionar maior atividade antimicrobiana. Devido ao caráter catiônico, a quitosana sozinha tem a particularidade de se ligar a parede celular bacteriana através de interação eletrostática e pode causar danos por perturbar o transporte de nutrientes para a célula. Entretanto, quando em combinação com outros componentes, a quitosana pode ser ligar aos mesmos, em matrizes complexas, ocorrendo consequentemente a diminuição do seu efeito antimicrobiano (AIDER, 2010).

O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 8. O F calculado (47,66) foi muito maior que o F Tabelado $(0,90; 4; 12) = 2,48$. Como consequência, um modelo matemático foi gerado e superfícies de resposta foram obtidas.

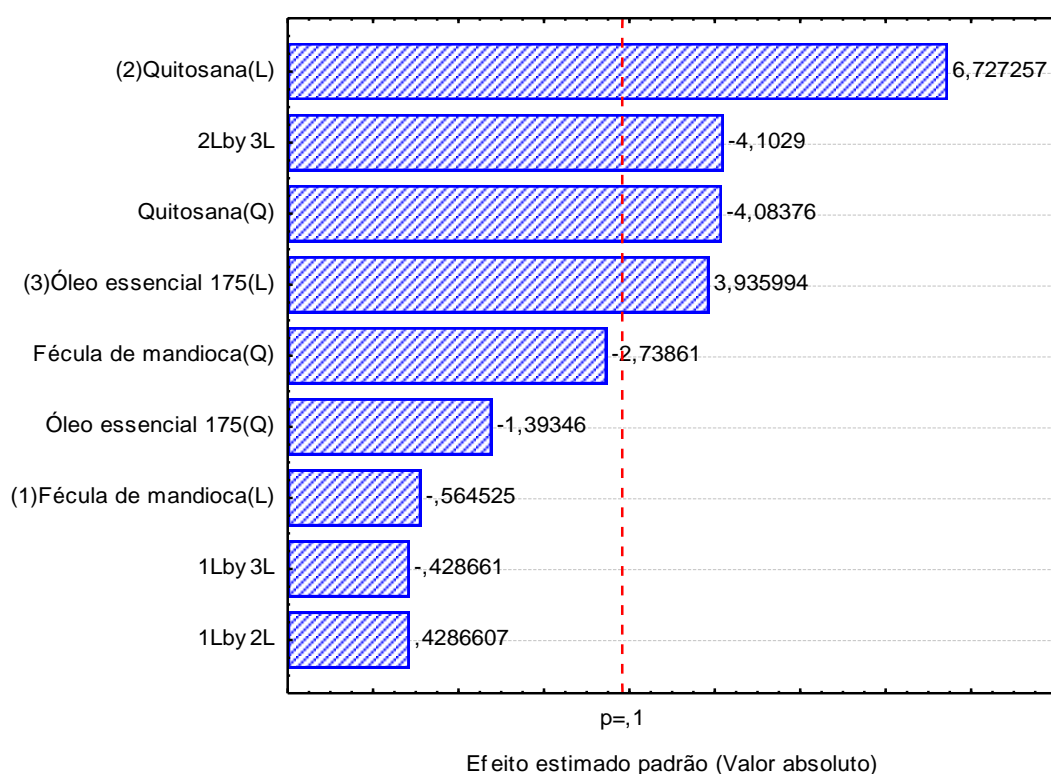


Figura 7- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial MYRO-175 frente ao *Bacillus cereus*.

Tabela 8- Análise de variância para atividade antimicrobiana das coberturas de quitosana contendo o óleo MYRO-175 frente ao *Bacillus cereus*.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (QM)	F calculado
Regressão	32,54898	4	8,13724	47,66
Resíduo	2,04867	12	0,17072	
Falta de ajuste	1,38200	5		
Erro puro	0,66667	2		
Total	34,59765	16		

F Tabelado (0,90; 4; 12) = 2,48

$R^2 = 0,94$

Na Equação 1 está apresentado o modelo codificado de segunda ordem para o tamanho do halo de inibição (mm) em função das concentrações de óleo essencial MYRO-175 e quitosana na cobertura comestível.

$$\text{Halo de inibição (mm)} = 10,35 + 2,10 [Q] - 1,42 [Q]^2 + 1,23 [OE] - 1,67[Q] [OE] \quad (1)$$

Na qual: [OE] é a concentração de óleo essencial (%) e [Q] é a concentração de quitosana (%) na cobertura.

A utilização de modelagem matemática e de métodos computacionais modernos é eficiente à otimização e controle de tais processos complexos, sendo de extrema importância em vários ramos da ciência e tecnologia de alimentos, para a garantia da qualidade dos produtos (RUSSO et al., 2012).

A análise da superfície de resposta (Figura 8) mostra a região ótima (área vermelha mais escura do gráfico), onde podem ser obtidos os maiores valores de halos de inibição para a bactéria *B. cereus*, utilizando-se coberturas contendo óleo essencial MYRO-175 na concentração entre 1,4 e 2,5% e quitosana entre 0,5 e 2,0%. Neste sentido, a otimização significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada na superfície definida pelos fatores (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

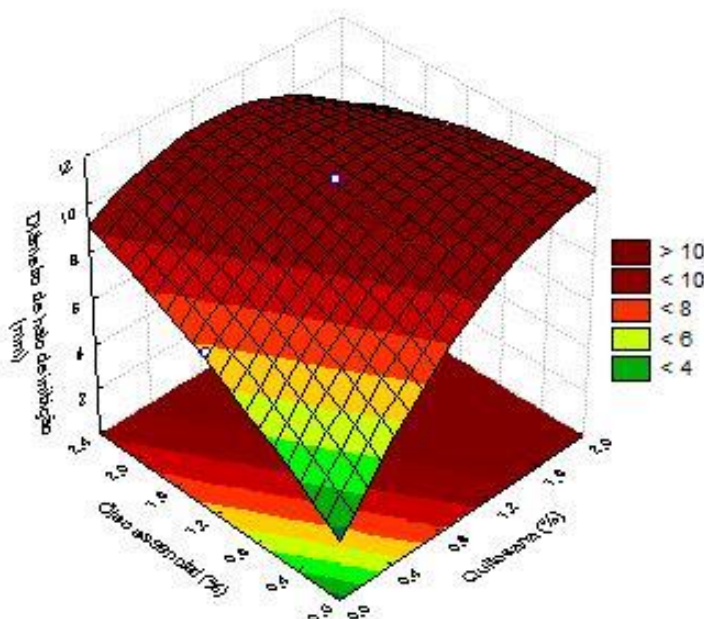


Figura 8- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO-175 frente ao *Bacillus cereus* em função das concentrações de óleo essencial e quitosana.

5.3.2. Análise estatística para o *B. subtilis*

Os efeitos dos parâmetros na atividade antimicrobiana de coberturas comestíveis incorporadas com óleo essencial MYRO-175 frente ao *Bacillus subtilis* pode ser verificado através do gráfico de pareto da Figura 9. Dentre as variáveis independentes, a quitosana (linear) apresentou resultados mais significativos, no entanto, apresentou efeito negativo, ou seja, valor menor deste parâmetro irá proporcionar maior atividade antimicrobiana. Óleo essencial MYRO-175 (linear) demonstrou efeito positivo, isto é, quanto maior o valor deste parâmetro, maior será a atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis (halos de inibição) ao nível de 90% de significância ($p < 0,1$).

A análise de variância (ANOVA) para *Bacillus subtilis* – óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes 175 foi obtido um modelo empírico apresentada na Tabela 9, O F calculado (106,24) foi muito maior que o F Tabelado $(0,90; 2; 13) = 2,76$. Como consequência, um modelo matemático foi gerado e superfícies de resposta foram obtidas.

Na Equação 2 está apresentado o modelo codificado de segunda ordem para o tamanho do halo de inibição (mm) em função das concentrações de óleo essencial MYRO-175 e quitosana na cobertura comestível.

$$\text{Halo de inibição (mm)} = 11,32 - 2,70 [Q]^2 + 1,35 [OE] \quad (2)$$

Na qual: [OE] é concentração de óleo essencial (%) e [Q] é a concentração de quitosana (%) na cobertura.

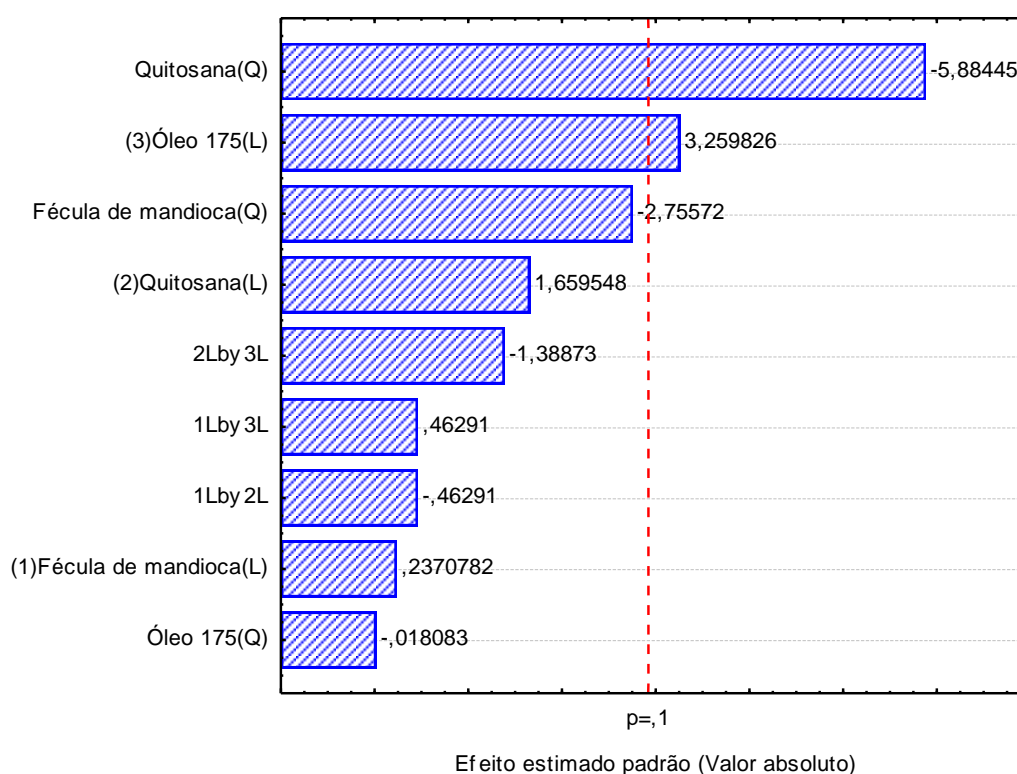


Figura 9- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes 175 frente ao *Bacillus subtilis*.

Tabela 9- Análise de variância para *Bacillus subtilis* – óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes 175.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (QM)	F calculado
Regressão	32,56648	2	16,28324	106,24
Resíduo	1,99234	13	0,153257	
Falta de ajuste	0,82567	5		
Erro puro	1,16667	2		
Total	34,55882	16		

F Tabelado (0,90; 2; 13) = 2,76
R = 0,94

A análise da superfície de resposta (Figura 10) mostra a região ótima (área vermelha mais escura do gráfico) para a inibição do *B. subtilis*, utilizando valores entre 2,3 e 2,5% de óleo essencial e quitosana entre 0,7 e 1,4%.

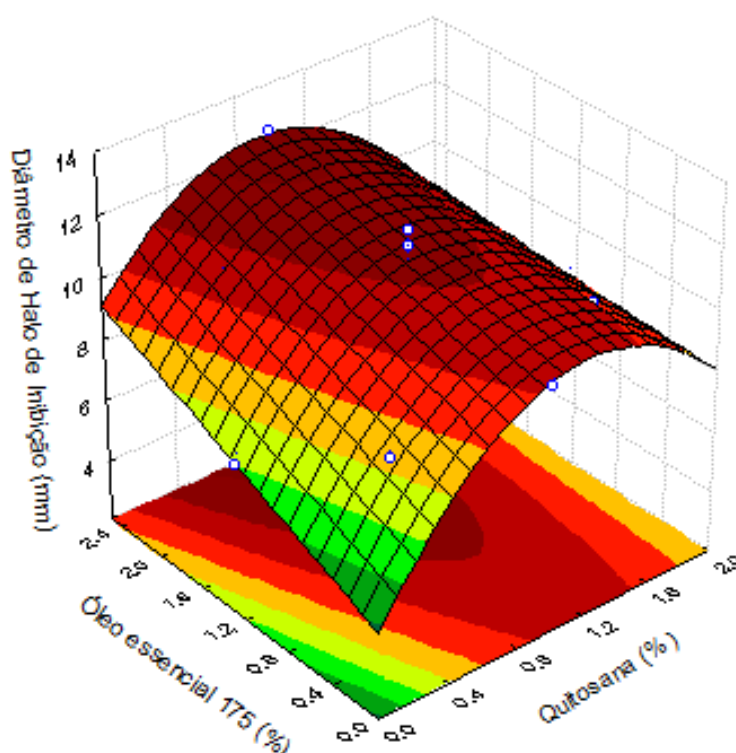


Figura 10- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO-175 frente ao *Bacillus subtilis* em função das concentrações de óleo essencial e quitosana.

5.3.3. Análise estatística para o *S. marcescens*

O gráfico de pareto da Figura 11 demonstrou que as variáveis independentes: quitosana (linear) e (quadrática), óleo essencial MYRO-175 (quadrática) e fécula de mandioca (quadrática) apresentaram resultados estatisticamente significativos. A quitosana (linear) demonstrou efeito positivo, isto é, quanto maior o valor deste parâmetro, maior será a atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis (halos de inibição) frente ao *S. marcescens* ao nível de 90% de significância ($p < 0,1$). Já os parâmetros quitosana (quadrático), óleo essencial MYRO-175 (quadrática) e fécula de mandioca (quadrática) demonstraram efeito negativo, ou seja, valores menores irão proporcionar maior atividade antimicrobiana.

O modelo empírico obtido para *S. marcescens* – óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes 175 foi validado pela análise de variância (ANOVA) está apresentado na Tabela 10. O F calculado (33,28) foi muito maior que o F Tabelado $(4; 12) = 2,48$.

Como consequência, um modelo matemático foi gerado e superfícies de resposta foram obtidas.

Na Equação 3 está apresentado o modelo codificado de segunda ordem para o tamanho do halo de inibição (mm) em função das concentrações de óleo essencial MYRO-175, quitosana e fécula de mandioca na cobertura comestível.

Equação:

$$\text{Halo de inibição (mm)} = 9,66 - 1,50 [\text{FM}]^2 + 1,06 [\text{Q}] - 1,51 [\text{Q}]^2 - 1,51 [\text{OE}]^2 \quad (3)$$

Na qual: [OE] é concentração de óleo essencial (%) e [Q] é a concentração de quitosana (%) e [FM] é a fécula de mandioca na cobertura.

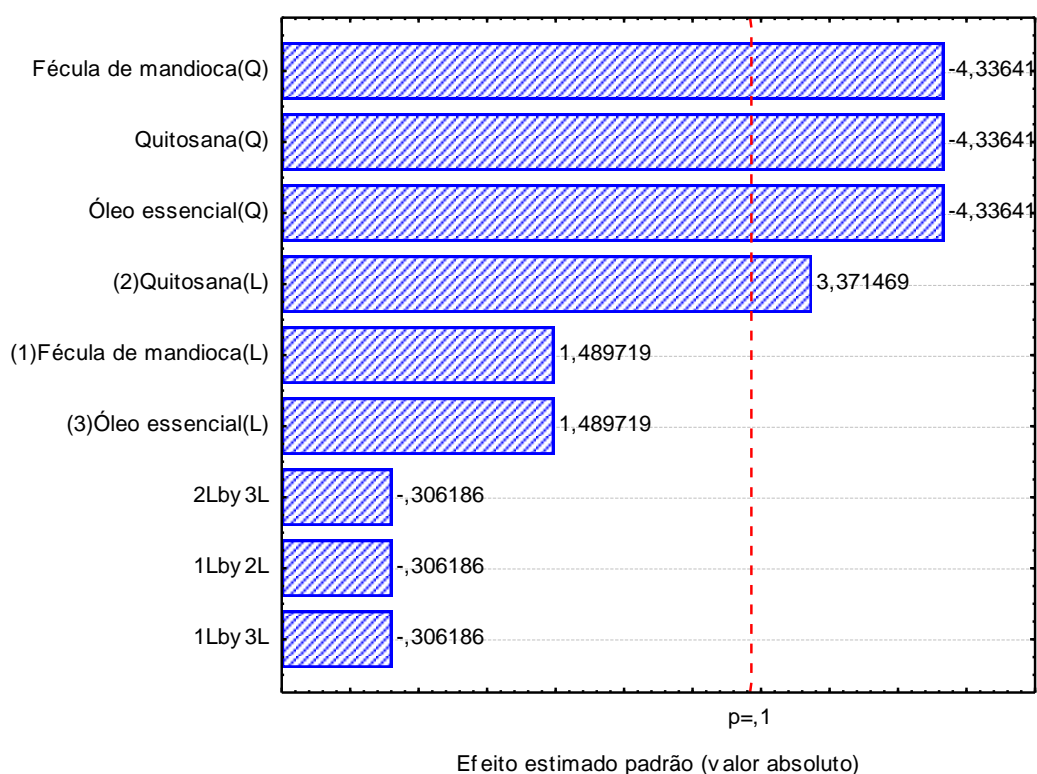


Figura 11- Gráfico de pareto da influência dos parâmetros na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis a base de quitosana incorporados com óleo essencial MYRO-175 frente à *Serratia marcescens*.

Tabela 10- Análise de variância para *Serratia marcescens* – óleo essencial *Myrcia ovata* Cambessedes 175.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (QM)	F calculado
Regressão	17,32092	4	4,33023	33,28
Resíduo	1,56143	12	0,13012	
Falta de ajuste	0,89476	5		
Erro puro	0,66667	2		
Total	18,88235	16		

F_{tab} (4;12);10%= 2,48

R² = 0,90

A análise da superfície de resposta mostra a região ótima para a inibição da *S. marcescens*, apresentada nas Figuras 13 e 14, onde podem ser obtidos os maiores valores de halos de inibição utilizando valores entre 1,0% e 1,7% de óleo essencial, 0,3% e 0,7% de fécula de mandioca e 0,6% e 1,7% de quitosana.

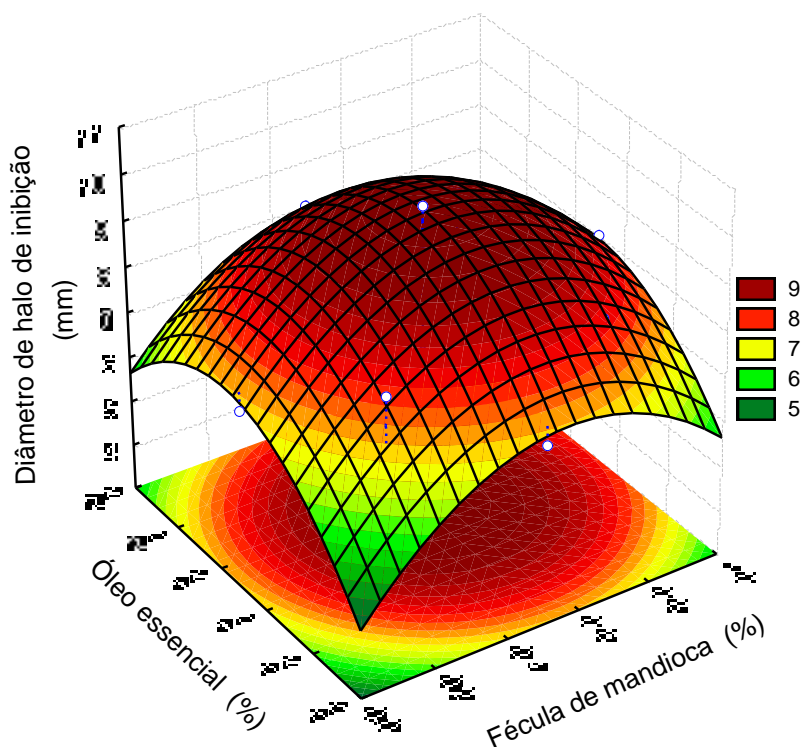


Figura 12- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO- 175 frente à *Serratia marcescens* em função das concentrações de óleo essencial e fécula de mandioca.

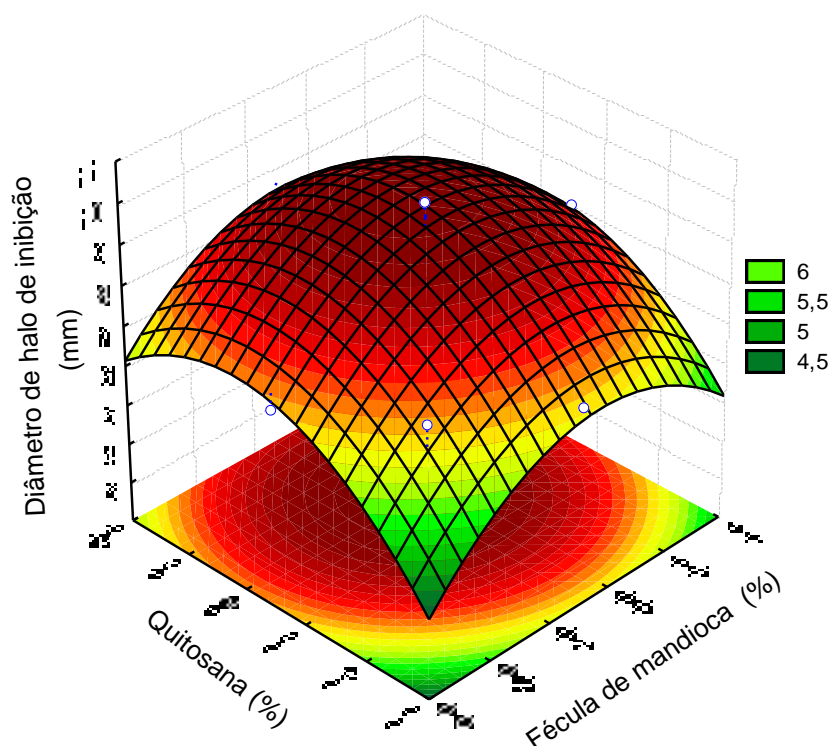


Figura 13- Superfície de resposta para atividade antimicrobiana da cobertura comestível incorporada com MYRO -175 frente à *Serratia marcescens* em função das concentrações de quitosana e fécula de mandioca.

Para ambos os micro-organismos (*B. cereus* e *B. subtilis*) verificou-se que quanto maior a concentração de óleo essencial na cobertura maior o efeito antimicrobiano. Já para a bactéria *S. marcescens* verificou-se que quanto maior a concentração de quitosana na cobertura comestível maior o efeito antimicrobiano. Este resultado também foi constatado por Abdollahi; Rezaei; Farzi (2012) os quais avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de filmes comestíveis de quitosana contendo óleo essencial de alecrim, e observaram que quanto maior a concentração de óleo essencial, maior o diâmetro do halo de inibição frente aos micro-organismos testados e também por Biottencourt et al. (2014) os quais verificaram que quanto maior a concentração do óleo essencial de hortelã incorporado no filme comestível maior foi a atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e *S. enteritidis*.

Na literatura consultada há apenas o estudo realizado por Azevedo et al. (2014) sobre a utilização de metodologia de resposta para avaliar o efeito dos componentes na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis. Estes autores

também obtiveram a concentração do óleo essencial e de quitosana como parâmetros significativos para a atividade antimicrobiana das coberturas frente ao *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. marcescens* e *S. enteritidis*. Os autores observaram que a máxima inibição de *S. aureus*, *B. subtilis*, a *S. marcescens* e a *S. enteritidis* pode ser obtida em concentrações de óleo essencial entre 2,8 e 3,0% e quitosana em concentrações entre 0 e 1,0%; 0 e 1,5%; 0 e 1,5% e 0,5 a 2,0%, respectivamente.

As características de uma cobertura comestível, para que responda de forma satisfatória como barreira, dependem não somente do material em si, mas igualmente do produto a ser revestido, cuja fisiologia tem um papel relevante nas condições de conservação (ASSIS; BRITO, 2014).

5.4 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE MANGABAS REVESTIDAS COM COBERTURAS COMESTÍVEIS INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL

Os testes *in vitro* demonstraram que as formulações de coberturas comestíveis 14 (0,5% de fécula de mandioca, 1,0% de quitosana e 2,5% de EO) e 15 - 17 (0,5% de fécula de mandioca, 0,5% de quitosana e 1,25% de EO) (repetição do ponto central) apresentaram maiores halos de inibição, sobretudo quando usado o óleo MYRO-175. Entretanto, selecionou-se a formulação 10 (1,0% de fécula de mandioca; 1,0% de quitosana e 1,25% de óleo essencial MYRO 174 ou 175), a qual continha menor quantidade de EO, visto que em trabalhos prévios tem sido verificado que a incorporação dos óleos essenciais em concentração maior que 2,0% pode provocar alterações nas características sensoriais da fruta, tornando-a indesejável para consumo. Como consequência, os pesquisadores têm sugerido que os óleos essenciais devem ser incorporados em concentrações menores nos revestimentos comestíveis para minimizar seu impacto sobre a percepção olfativa (PERDONES et al., 2012).

As coberturas foram aplicadas em mangabas *in natura* e em mangabas contaminadas artificialmente com *B. cereus* e o efeito antimicrobiano das mesmas foram avaliados durante a estocagem refrigerada das frutas. Esta bactéria foi selecionada pelo fato de ter sido um dos mais sensíveis às coberturas comestíveis e por ser um patógeno causador de doença grave, cujo habitat natural é o solo

(BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; PAIVA et al. 2009), ou seja, pode ser encontrado como contaminante em frutas como as mangabas. As frutas *in natura* foram avaliadas quanto a microbiota natural e as frutas com *B. cereus* quanto ao crescimento desta bactéria, a cada 2 dias de armazenamento sob refrigeração à 10°C. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Os resultados mostraram que as mangabas *in natura* sem revestimento apresentaram contagens de bactérias aeróbias mesófilas totais, bolores e leveduras da ordem de 10^4 UFC g⁻¹ no dia 0 e esta quantidade foi mantida até o 8º dia de armazenamento (Figura 15 A, 16 A). As mangabas controle apodreceram no 10º dia de armazenamento não sendo possível realizar as contagens microbiológicas.

Nas mangabas *in natura* revestidas com coberturas contendo o óleo MYRO-174 as contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas diminuíram de 10^4 UFC g⁻¹ no dia 0 para a ordem de 10^2 UFC g⁻¹ no 4º dia de armazenamento, no 6º dia na ordem 10 UFC g⁻¹ e a partir do 10º dia na ordem 10^2 e assim manteve até o 12º dia de armazenamento (Figura 15 A e B). Para contagem de bolores e leveduras, as mangabas revestidas com coberturas contendo o óleo MYRO- 174 diminuíram de 10^4 UFC g⁻¹ no dia 0 para a ordem de 10^3 UFC g⁻¹ no 2º dia de armazenamento, a partir do 4º dia mantida na ordem < 10 UFC g⁻¹ (Figura 16 A e B).

Nas mangabas *in natura* revestidas com coberturas contendo o óleo MYRO-175 as contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas diminuíram de 10^4 UFC g⁻¹ no dia 0 para 10^2 UFC g⁻¹ a partir do 4º dia de armazenamento, mantendo nessa ordem até o 12º dia de armazenamento (Figura 15 A e B). Para contagem de bolores e leveduras, as mangabas revestidas com coberturas contendo o óleo MYRO- 175 diminuíram de 10^4 UFC g⁻¹ no dia 0 para a ordem de 10^2 UFC g⁻¹ no 2º dia de armazenamento e a partir do 4º dia manteve-se na ordem < 10 UFC g⁻¹ até o final de armazenamento (12 dias) (Figura 16 A e B).

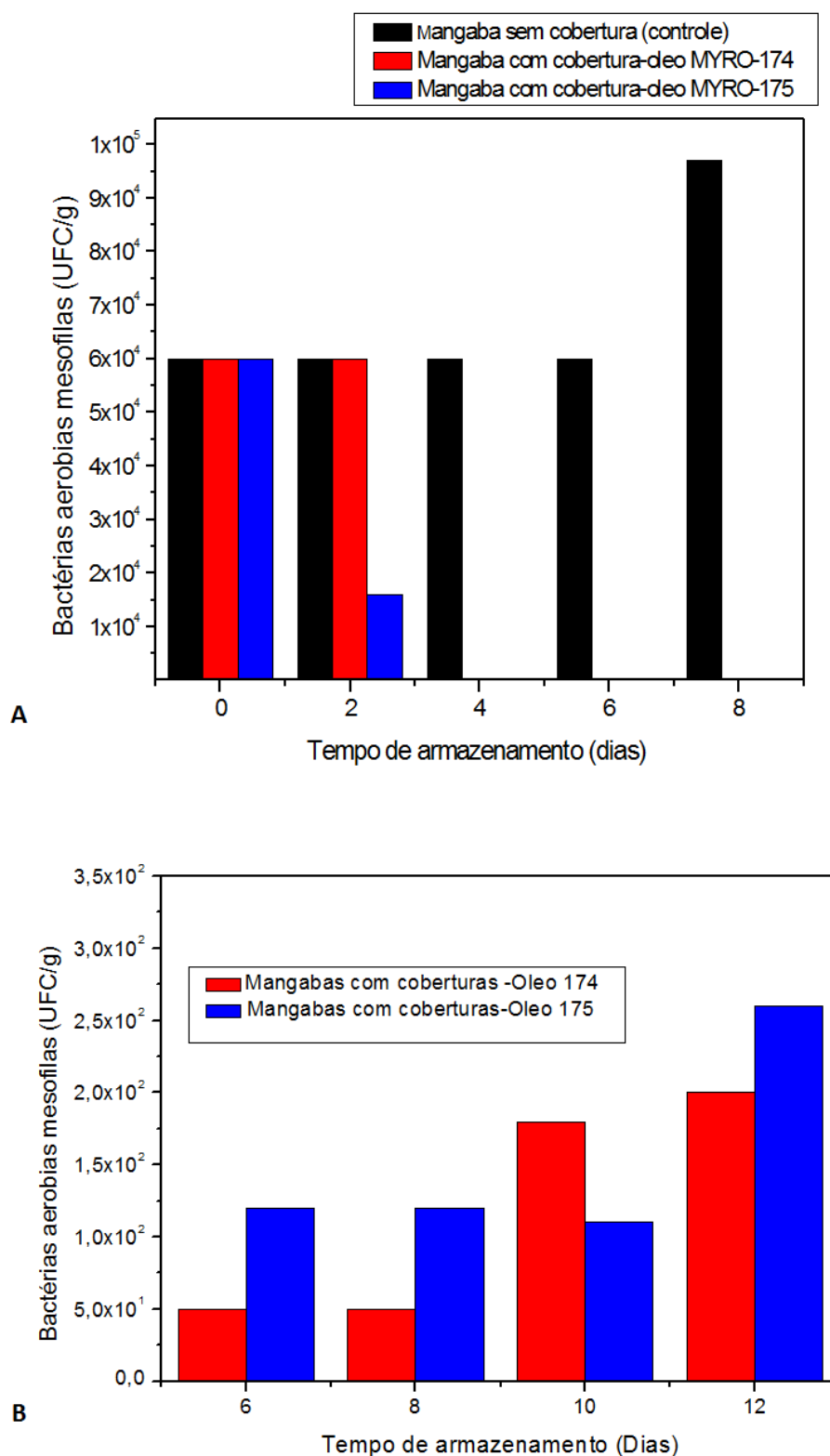
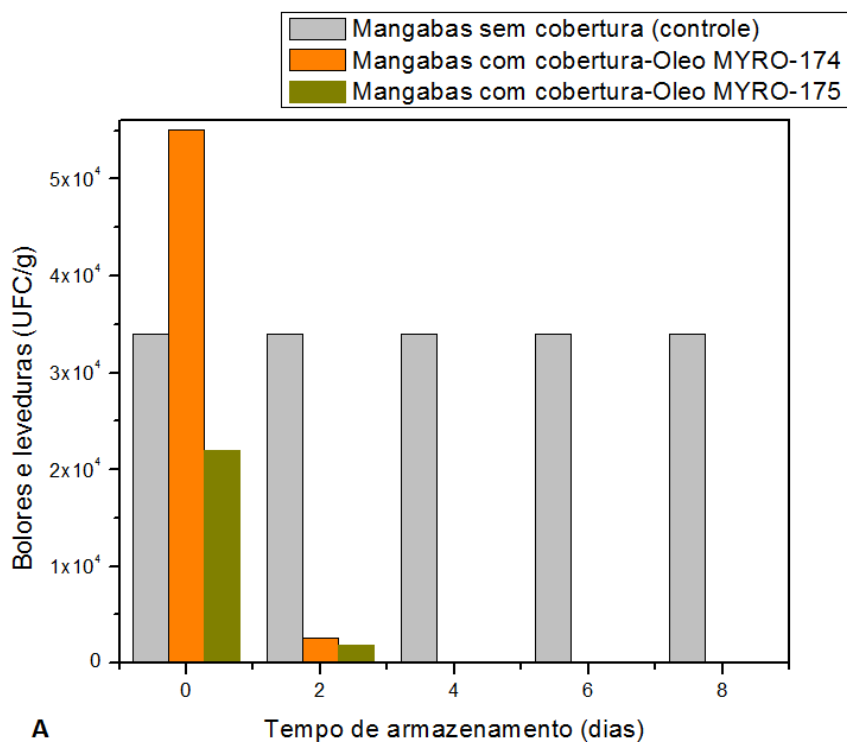
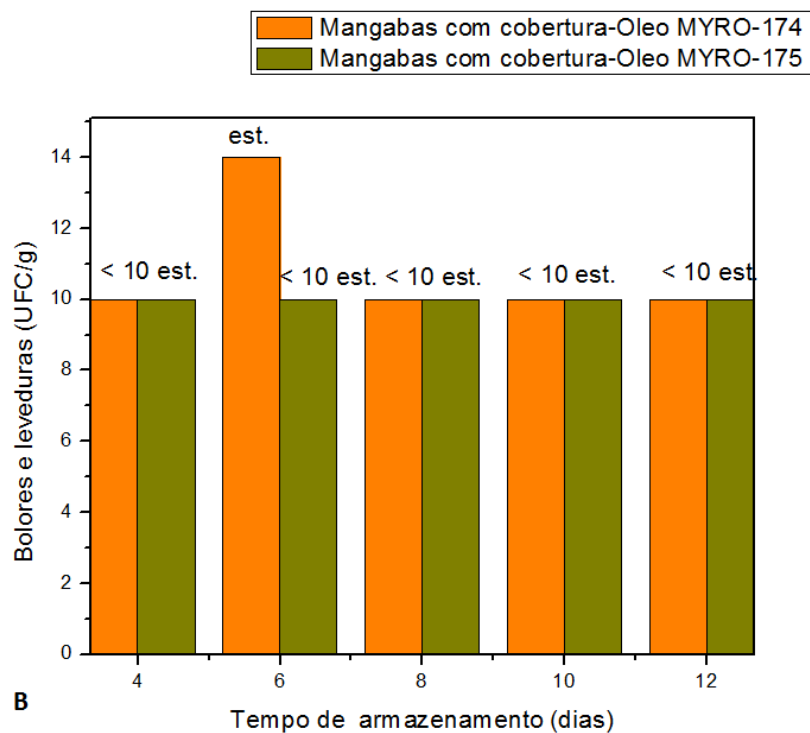


Figura 14- Contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas (A) em mangabas com e sem coberturas comestíveis nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento à temperatura de 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis incorporadas com MYRO-174 e MYRO-175 nos tempos 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento à temperatura de 10°C.



A



B

Figura 15- Contagens de bolores e leveduras (A) em mangabas com e sem coberturas comestíveis nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento à temperatura de 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis incorporadas com MYRO-174 e MYRO-175 nos tempos 4, 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento à temperatura de 10°C.

As mangabas *in natura* não continham *B. cereus*, sendo artificialmente contaminadas com esta bactéria. Ao longo do armazenamento a contagem de *B. cereus* aumentou, sendo da ordem de 10^4 UFC g⁻¹ no 8º dia de estocagem (Figura 17 A). A partir da 10º dia de armazenamento as mangabas contaminadas com esta bactéria (controle) apodreceram, não sendo possível realizar as contagens microbiológicas. Já para as mangabas inoculadas com *B. cereus* e revestidas com cobertura contendo o óleo MYRO-174 ou o óleo MYRO-175, verificou-se a diminuição na contagem da bactéria durante o armazenamento, mantendo-se na ordem de 10 UFC g⁻¹ até o 12º dia de estocagem (Figura 17 B).

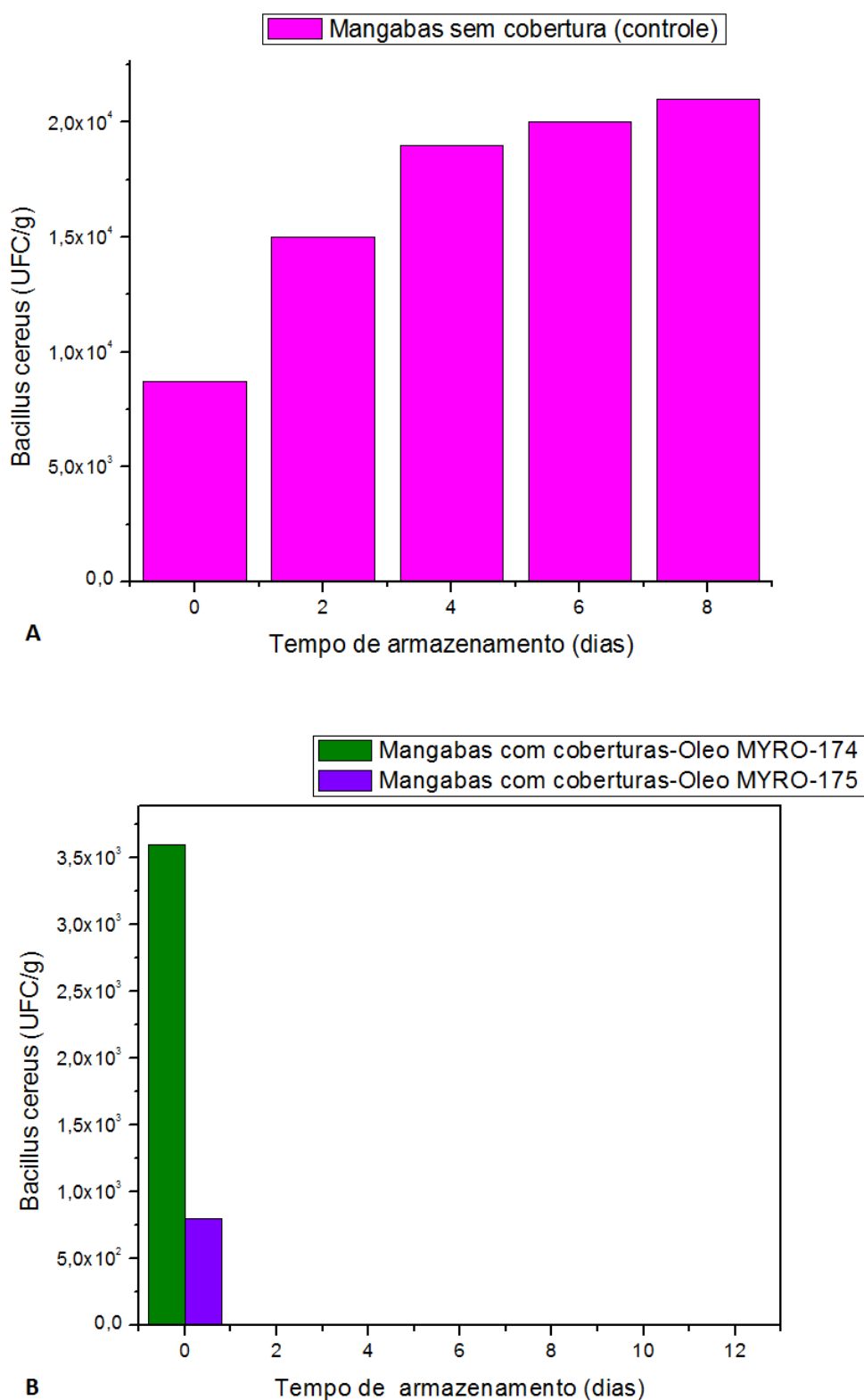


Figura 16- Contagem de *Bacillus cereus* (A) em mangabas não revestidas durante 8 dias de estocagem à 10°C e (B) em mangabas revestidas com coberturas comestíveis contendo MYRO-174 ou MYRO-175 durante 12 dias de estocagem à 10°C.

A Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos – item Frutas, produtos de frutas e similares, estabelece padrões para Coliformes a 45°C e *Salmonella sp.* em 25g (BRASIL, 2001). Porém essa legislação não estabelece limites para contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais, bolores e leveduras, e nem para o *B. cereus*.

Na literatura consultada não há registros de aplicação de coberturas ou filmes comestíveis em mangabas. Alguns pesquisadores têm aplicado revestimentos comestíveis em frutas tais como: Borges et al. (2013) os quais constataram que morangos revestidos com filme à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia, armazenados a 4°C durante 12 dias, apresentaram aumento da deterioração fúngica de 5,0% somente a partir do 9º dia de armazenamento. Cortez-Vega et al. (2013) constataram que mamão minimamente processado revestidos com cobertura comestível à base de goma xantana adicionados de goma guar e/ou quitosana apresentaram aumento de micro-organismos psicrófilos de 6 log UFC/g no 12º dia, de armazenamento a 4°C, enquanto que as amostras controle (sem revestimento) apresentaram aumento de 10 log UFC/g neste mesmo período. Azarakhsh et al. (2014) utilizaram coberturas comestíveis à base de alginato incorporadas com 0,3% e 0,5% de óleo essencial de erva-cidreira para prolongar a vida de prateleira do abacaxi minimamente processado e verificaram que houve um aumento na contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, porém os valores foram menores (redução de 2 log) que os obtidos com as amostras controle.

Azevedo et al. (2014) obtiveram em morangos revestidos com coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleo essencial de *L. gracilis* Schauer redução no crescimento de bolores e leveduras para <10 UFC/g até o 7º dia de armazenamento. O desempenho das coberturas foi similar ao obtido neste trabalho a partir do 4º dia de armazenamento com mangabas. Quanto à contagem de psicrótróficos, os autores verificaram que a mesma manteve-se na ordem <10 UFC/g do dia 0 até o 7º dia de armazenamento.

Jo et al. (2014) verificaram que após 5 meses de armazenamento, a contagem de bactérias aeróbias totais em maçãs revestidas com coberturas comestíveis a base de cera de carnaúba incorporadas com nano emulsão de erva cidreira foi diminuída em 1,4 log UFC/g em comparação com as maçãs não revestidas. Além disso, a contagem de leveduras e bolores em maçãs não revestidas foi de 2,2 log UFC/g, e não foram detectados nas maçãs revestidas.

Moreira et al. (2014) avaliaram melões minimamente processados revestidos com cobertura comestível (em múltiplas camadas) à base de quitosana incorporado com óleo essencial armazenados à 4°C por 15 dias. Os autores verificaram que os melões revestidos apresentaram uma diferença, na contagem final de bactérias mesófilas no 15º dia, de 6 ciclos log UFC g⁻¹ quando comparado com as futas não revestidas. Aquino; Blank; Santana (2015) constataram que goiabas revestidas com cobertura comestível à base de quitosana incorporadas com misturas de óleos essenciais de *L. gracilis* Schauer (1% e 2%) apresentaram um aumento, nas contagens de bactérias aeróbias mesófilas totais e bolores e leveduras, de 2 ciclos log quando utilizados óleo essencial a 1% e de 1 ciclo log quando utilizado óleo essencial a 3%. Para coliformes termotolerantes os valores foram menores que 3,0 NMP/g até o 10º dia de armazenamento. Através da análise desses resultados pôde-se verificar que, diferente da presente pesquisa, houve aumentona contagem de micro-organismos com utilização de óleo essencial em maiores concentrações.

Rodriguez-Garcia et al (2016) observaram o não crescimento do fungo *Alternaria alternata* em tomates revestidos com cobertura comestível à base de pectina adicionada de óleo essencial de orégano (concentração= 36,1mg/mL) armazenados durante 12 dias a 12,5°C. Já os tomates revestidos com coberturas adicionadas de óleo em menores concentrações (15,7 mg/mL; 25,9 mg/mL), bem como os frutos não revestidos apresentaram maior índice de degradação pelo fungo a partir do 9º dia de armazenamento.

As coberturas comestíveis à base de quitosana incorporadas com óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes (MYRO-174 ou MYRO-175) foram eficazes na preservação da qualidade microbiológica de mangabas armazenadas durante 12 dias à 10°C. Porém os óleos essenciais modificaram a coloração das superfícies dos frutos quando comparado aos frutos não revestidos conforme demonstrado na Figura 18. Como consequência é necessário estudar faixas menores de concentrações do óleo essencial a ser adicionado nas coberturas para manter as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais.

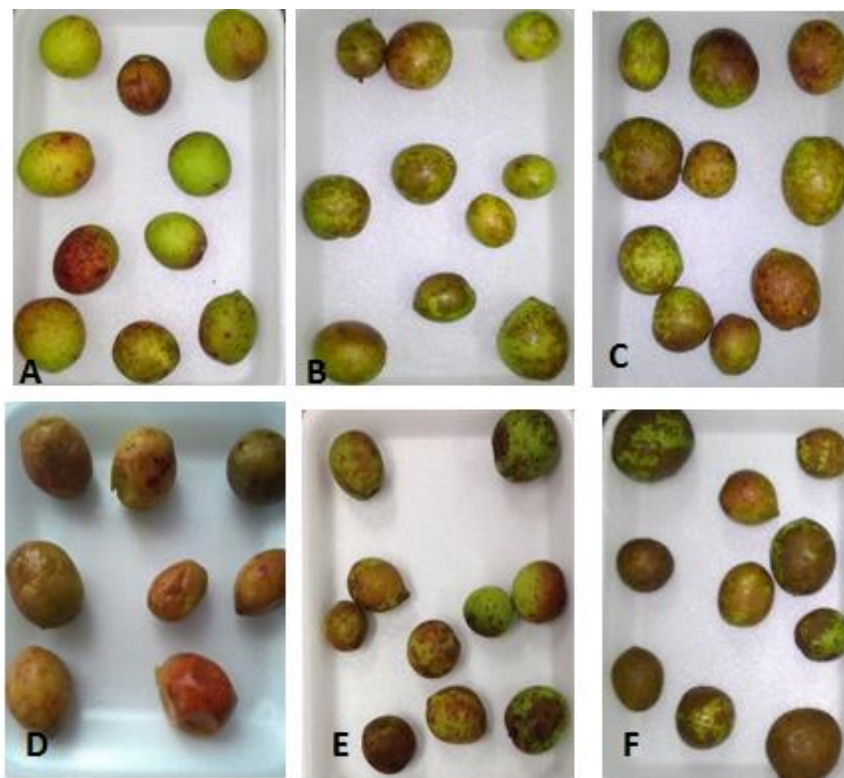


Figura 17- Mangabas *in natura* sem cobertura comestível (controle) no dia 0 (A); Mangabas *in natura* revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-174 no dia 0 (B); Mangabas *in natura* revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-175 no dia 0 (C); Mangabas *in natura* sem cobertura comestível (controle) no 8º dia (D); Mangabas *in natura* revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-174 no 12º dia (E); Mangabas *in natura* revestidas com cobertura comestível incorporada óleo MYRO-175 no 12º dia de armazenamento à 10°C (F).

6. CONCLUSÕES

- As coberturas comestíveis de quitosana incorporadas com óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes (1% fécula de mandioca, 1% de quitosana, 1,25% de óleos essenciais MYRO-174 ou MYRO-175) foram efetivas para o controle de bactérias totais aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e de *Bacillus cereus* em mangabas com redução de 2, 1 e 1 ciclos log, respectivamente, respectivamente, as contagens destas bactérias durante a estocagem refrigerada por 10 dias. Já nas mangabas sem revestimento as contagens de micro-organismos aumentaram e as mesmas apodreceram a partir do 8º dia de armazenamento.
- Neste trabalho 9 óleos essenciais de *M. ovata* Cambessedes oriundos de plantas da região de Japarutuba, Sergipe demonstraram potencial antimicrobiano frente a bactérias patogênicas de alimentos, com halos de inibição que variaram de 10 a 32 mm;
- Particularmente a *P. aeruginosa*, a qual é resistente a maioria das substâncias antimicrobianas, foi de sensível a extremamente sensível a estes óleos essenciais;
- A concentração de óleo essencial foi o parâmetro que mais influenciou na atividade antimicrobiana das coberturas comestíveis frente às bactérias patogênicas testadas;
- Foi possível obter modelos matemáticos preditivos para a inibição de *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. marcescens* utilizando coberturas comestíveis contendo 0,5% de fécula de mandioca;

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar testes de toxicidade do óleo essencial para viabilizar seu uso em alimentos;
- Avaliar o efeito das coberturas nas características físico-químicas e sensoriais das mangabas;
- Estudar propriedades reológicas e morfológicas das coberturas comestíveis.

REFERÊNCIAS

ADOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZE, M.. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2 , p. 343–350, july, 2012.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 837-842, 2010.

ALI, A.; NOH, N. M.; MUSTAFA, M. A.. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food packaging and shelf life**, v. 3, p. 56–61, 2015.

ALVAREZ, M. V.; PONCE, A. G; MOREIRA, M. D. R.. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 78-87, january, 2013.

ALVES, M. F. et al. *Myrcia lundiana* Kiaersk native have diferente essential oil composition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 266-273, july, 2016.

AKIN, M.; AKTUMSEK, A.; NOSTRO, A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn.and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 531-535, january, 2010.

AMORIM, B. S.; ALVES, A.. Myrtaceae from lowland Atlantic Forest areas in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 40, p. 33–54, 2012.

AQUINO, A. B. DE; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. de A. Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. **Food Chemistry**, v. 171, p. 108–116, 2015.

ARAÚJO, M. L. de et al. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 985-990, july-aug., 2013.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana – Ação biofúngica sobre frutas fatiadas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, jan.-jun., 2003.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. DE; FORATO, L. A.. O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas *in natura* e minimamente processadas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, EMBRAPA, São Carlos, p.1-23, 2009.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. de. Revisão: Cobertura comestíveis protetora de frutas: fundamentos e aplicações. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 87-97, abr.-jun., 2014.

ATARES, L. et al.. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 384-391, 2010.

AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L T. Frutros do cerrado: preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 15, p. 36-41, 2003.

AZARAKHSH, M. et al. Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based ediblecoating for shelf-life extension and quality retention offresh-cut pineapple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 88, p. 1–7, 2014.

AZEVEDO, A. N. et al. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 43, p.1-9, 2014.

BATISTA, N. N. et al. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. **Alim. Nutr.Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 25, n. 1, p. 19-24, jan-mar, 2014.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. **Forvisão**, v. 1, n. 1, p. 1-109, 2003.

BEZERRA, A. M. E. et al. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 26-29, 2008.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance Material Review on isopulegol. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, suppl 11, p. 185- 189, nov., 2008.

BITENCOURT, R. G. Antimicrobial and aromatic edible coating on fresh-cut pineapple preservation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.6, p.1119-1125, jun, 2014.

BONILLA, J.; ATARES, L.; VARGAS, M.; CHIRALT A.. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110,p. 208–213, 2013.

BORGES, C. D. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**,Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, sept.- oct., 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

_____.Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003, seção 1, p.04.

BURT, S. Essential oils their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

CÂNDIDO, C. S. et al. Effects of *myrcia ovata* Cambessedes Essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**,v. 41, p.621-627, 2010.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L.The potential of origanum vulgare L. (lamiaceae) essential oil in inhibitingthe growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362-367, 2008.

CARNELOSSI, M. A. G. Conservação pós-colheita de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciênc.Agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1119-1125, set.-out., 2004.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (*Myrtaceae*): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 23881-23904, 2015.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F., MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CEBORSKA, M. SZWED, K. SUWINSKA, K. beta-Cyclodextrin as the suitable molecular container for isopulegol enantiomers. **Carbohydr Polym**, v. 97, n. 2, p. 546-50, sep., 2013.

CHEN, Z. Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from *Alpinia guilinensis* against selected foodborne pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 607–613, 2016.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y.. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2806–2814, may, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard: Eleventh edition, M02–11. Wayne, PA: CLSI. 2012.

CORTEZ-VEGA, et al. Conservação de mamão minimamente processado com uso de revestimento comestível à base de goma xantana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1753-1764, jul.-ago., 2013.

CRUZ, M. de M. et al. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, CV. Kent. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 1-6, mar.-jun., 2012.

DE LA CRUZ, M. G. F. **O uso de óleos essenciais na terapêutica**. 2002. Disponível em: <http://laszlo.ind.br/admin/artigos/arquivos/oleosnaterapeutica.pdf>. Acesso em: 06/11/2015.

DJENANE, D., et al. Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v. 22, p. 1046–1053, 2011.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1819-1841, 2013.

EPISTEIN, L. Mangaba: coisa boa de comer. **Revista Bahia Agrícola**, v. 6, n. 2, p. 19-22, 2004.

FADINI, A. L. et al. mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen-cocoa butter edible films plasticized with sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 30, 2, p. 625-631, march., 2013.

FALCONE, D. M. B.; AGNELLI, J. A. M.; FARIA, L. I. L.de. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. *Polímeros*. v. 17, n.1, jan.-mar., 2007.

FALGUERA, V. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292 – 303, 2011.

FDA, Food Drug Administration. 2015. Department Of Health And Human Services. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) In.: Substances generally recognized as safe. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.20>. Acesso em: 05/01/2016.

FERNANDES, A. P. S. et al. Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 192-199, abr.- jun., 2015.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; CARRIÓN-GRANDA, X.; MATÉ, J. I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 36, p. 69-75, 2014.

FURTADO, R. F. et al. Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

FURTADO, J. M. et al. Atividade Antimicrobiana do Extrato Aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* Frente a Bactérias de Interesse. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 17, n.4, p. 233-237, 2015.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. **Fitoterapia**, v.79, p. 199 - 203, 2008.

GOUDJIL, M. B. et al. Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus*

nobilis Lauraceae. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 379-385, 2015.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G.. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 122–127, 2016.

GUERREIRO, A. C. et al.. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 226–233, febr., 2015.

HERRING, P.; ZHAO, Y.. Fortified food wrap is good enough to eat. Disponível em: <http://oregonstate.edu/news/release/2004/07/fortified-food-wrap-good-nough-eat>. Acesso em: 26 de junho de 2016.

HONG, K. et al. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, v.144, p. 172–178, 2012.

HUSSAIN, A. I. et al.. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p.986-995, 2008.

ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C.

JAFRI, H.; HUSAIN, F. M.; AHMAD, I. Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Biomed. Ther. Sci.**,v. 1, n. 1, p. 65-71, 2014.

JANJARASSKUL, T.; Krochta, J. M.. Edible packaging materials. **Ann. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 1, p. 415-448, 2010.

JIROVETZ, L. et al. Purity, Antimicrobial activities and olfactic evaluations of Geraniol/Nerol and various of their derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 288-291, 2007.

JO, W. S. et al. Quality and microbial safety of 'Fuji' apples coated with carnauba-shellac wax containing lemongrass oil. **LWT - Food Science and Technology**, V. 55, n. 2, p. 490–497, mar, 2014.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: a new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, v.107, p. 845-852, 2008.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M.. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology e Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, may, 2010.

KERROLLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal Agric. Food Chem.** v.42, p. 776–781, 1994.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51–63, 2010.

LI, J. et al. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, p. 786 - 79, 2010.

LIMA, I. L. P.; SCARIOT, A. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da Mangaba. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 68 p., 2010.

LIMA, C. N. de; BUENO FILHO, J. S. de S.. Escolha de tratamentos otimizados na construção de fatoriais fracionários. **Rev. Bras. Biom.**, São Paulo, v. 28, n. 3, p.1-14, 2010.

LIMA, M. A. A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, sept., 2011.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LUVIELMO, M. de M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 8-15, jan-jun, 2012.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCÍA, M.A.; MARTINO, M.M.; ZARITZKY, N.E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.50, n.2, p.379-386, 2002.

MALI S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização Starch films: production, properties and potential of utilization. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, jan.- mar., 2010.

MALMIRI, H. J. et al. Effects of edible surface coatings (sodium carboxymethyl cellulose, sodium caseinate and glycerol) on storage quality of berangan banana (*Musa sapientum* CV. Berangan) using response surface methodology. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, 3, p. 252–261, june, 2012.

MATHEUS, N. B.; BARBIN, D.; GONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MCHUGH, T. H. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung, Berlin**, v. 44, n. 3, p. 148-151, 2000.

MENDES S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 29, n.3, p. 391-397, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan.- mar., 2016.

MOTA, V. de S.; TURRINI, R. N. T.; POVEDA, V. de B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Ver. Esc. Enferm. USP**, v. 49, n. 2, p. 216-220, 2015.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira.**, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, ago. 2009.

MOREIRA, S. P. et al. Freshness retention of minimally processed melon using diferente packages and multilayered edible coating containing microencapsulated essential oil. **International Journal of Food Science e Technology**, v. 49, n. 10, p. 2192- 2203, oct., 2014.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **I&EC Research**, v. 50, p. 4667- 4671, 2011.

NWABUEZE, T. U. Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1768–1776, 2010.

NETTO, C. G. Biofilmes antimicrobianos protegem alimentos. **Jornal da Unicamp**, Campinas, p.11, 2009.

OLIVEIRA, C. S.; GRDEN, L.; RIBEIRO, M. C. O.. Utilização de filmes comestíveis em alimentos. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Desenvolvimentos em Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 52-57, 2007.

OLIVEIRA M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OLIVEIRA C. M.; CONEGLIAN R. C. C.; CARMO M. G. F. Conservação pós-colheita de tomate cereja revestidos com película de fécula de mandioca. **Horticultura Brasileira**, v.33, p. 471-479, 2015.

ORIANI, V. B. et al. Properties of Cassava Starch-Based Edible Coating Containing Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, 2014.

OUATTARA, B. et al., Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 139-148, 2000.

PAIVA, E. de et al. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 170/171, mar.– abr., 2009.

PERDONES, A.. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v.70, p. 32–41, 2012.

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

PIRES, C. H. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n. 4, p. 597-601, 2013.

PLÁCIDO, G. R. et al. Use of pectin in the storage of mangaba fruits (*Hancornia speciosa* Gomes) associated with refrigeration. **African Journal Biotechnology**, v. 14, p. 2786-2799, sep., 2015.

PROENÇA, C. E. B. et al. Novelties in Myrtaceae: contributions to the Flora of the State of Sergipe, Brazil. **Phytotaxa**, v. 173, n. 3, p. 217–225, 2014.

QUEIROZ, M. R. A. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p.737-743, 2014.

RAMOS-GARCIA, M.. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomates. **Crop Protection**, v.38, p. 1-6, 2012.

RIBEIRO, C. et al. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2007.

RIZZO, H.; HOVELLA, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

ROCHA, M. M. L. et al. Conflitos em torno do extrativismo da mangaba em Sergipe: O caso do povoado pontal. **Fragmentos de cultura**, Goiânia, v. 25, n. 2, p. 143-158, abr.- jun., 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: casa o Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor. 2009. 358p.

RODRIGUEZ-GARCIA, I. et al. Within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. **J. Sci. Food Agric., Research Article**, 2016.

RUIZ-NAVAJAS, Y. et al. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food Control**, v. 30, p. 386-392, 2013.

RUNYORO, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 119, p. 311-316, 2010.

RUSSO, L.; ALBANESE, D.; SIETTOS, C. I.; MATTEO, M. D.; CRESCITELLI, S.A neuro-fuzzy computational approach for multicriteria optimisation of the quality of espresso coffee by pod based on the extraction time, temperature and blend. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.837–846, 2012.

SALVAGNINI, L. E. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 241-244, abr.-jun. 2008.

SAMPAIO, T. S. et al. Chemical diversity of a wild population of *Myrcia ovata* Cambessedes and antifungal activity against *Fusarium solani*. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 196–209, 2016.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al.. Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. **Journal of Food Engineering**, v.105, p. 138–143, 2011.

SANTOS, J. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, out.-dez. 2011.

SANTOS, G. M. dos. Essential Oil from *Myrcia ovata*: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. **Planta Med**, v. 80, p. 1588–1596, 2014.

SEVERINO, R. et al. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. **Food Control**, v. 50, p. 215-222, 2015.

SILVA, M. I. G. et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 2, p. 141-147, dec., 2007.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVA, A. V. C. da et al. Vida útil de mangaba colhida em dois estádios de maturação. **Boletim de Pesquisa- Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Aracaju, n. 80, p. 1-15, dez., 2013.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JR., E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2038- 2052, 2012.

SINGH, T. P.; CHATLI, M. K.; SAHOO, J.. Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, 5, p. 2530-2543, may., 2015.

SINTONIO, E. K.; MENEGALLI, F. C. Cubiertas y Películas Comestibles Aditivos Bioactivos para la Conservación de la Fruta. **Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales. Publicaciones e Investigación** v. 6, 2012.

SOARES, F. P. et al.. Cultura da Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, n. 67, p. 1-12, 2004.

SOARES, N.F.F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n.4, p. 370-378, 2009.

SOARES, N. F. F. et al. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E., p. 281-289, out, 2011.

SOUZA, F. G. de. et al.. Qualidade póscolheita de frutos de diferentes clones de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1449-1454, set./out., 2007.

SOUZA, et al. Polysaccharride from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaju) as coating for Tommy Atkins mangoes. **Chemical Paper**, v. 64, n. 4, p. 476-481, 2010.

SOUZA, I. C. F. S. et al.. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos físico, químico e microbiológico. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 1, p. 19-27, jan - mar, 2012.

SOUZA, A. L. G. de. Conhecimentos tradicionais associados e a prospecção tecnológica da *Hancornia speciosa* Gomes. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão/SE, v. 5, n. 4, p.2652-2663, 2015.

STÜLP, M. et al. Conservação e Qualidade de Mirtilo orgânico utilizando revestimento comestível a base de fécula de mandioca. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n.01, p. 713-721, 2012.

TAHA, K. F.; SHAKAU, Z. T. A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Volatile Oil of *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Grown in Egypt. **Med Aromat Plants**, v. 5, N. 3, p. 1-5, 2016.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

VALENZUELA, C., ABUGOCH, L., TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: mechanical, barrier and structural properties. **LWT- Food Science and Technology**, v.50, n. 2, p. 531-537, march, 2012.

VIEIRA, J. M. et al. Effect of chitosan Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 116, p. 88-87, june, 2016.

VU, K. D. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v. 44, p. 198–203, 2011.

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of down-flowing steam distillation system using step test analysis. **IEEE CSGRC**, New York, p. 197-201, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

1/6

FORMULAÇÕES DE COBERTURAS COMESTÍVEIS ANTIMICROBIANAS CAMPO DA INVENÇÃO

(001) A presente invenção refere-se a elaboração de coberturas comestíveis antimicrobianas a base de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial de *Myrcia ovata* (popularmente conhecido como “laranjinha do mato”).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

(002) Os biofilmes comestíveis são finas camadas de material comestível que revestem os alimentos, isolando-os, com o intuito de protegê-los fisicamente ou microbiologicamente, melhorando assim sua conservação. O termo cobertura expressa uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que o filme é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto. (KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v.40, n.12, p.47-59, 1986). As vantagens das coberturas comestíveis incluem a diminuição do transporte de gases e de umidade entre os alimentos e o meio, são revestimentos biodegradáveis, apresentam capacidade de transportar aditivos alimentares (p.ex. antioxidantes e antimicrobianos), podendo ser consumidos com alimentos (comestíveis), além de melhorarem a aparência dos produtos e consequentemente sua aceitação por parte dos consumidores (Elsabee, M.Z. & Abdou, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1819–1841, 2013).

(003) A quitosana é um polímero natural, derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose. Possui uma estrutura molecular formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) quimicamente similar à fibra vegetal da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. A quitosana é considerada não tóxica, biodegradável, biofuncional, biocompatível e vários pesquisadores já tem comprovado seu forte potencial antibacteriano e antifúngico (Aider, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 837–842, 2010). A atividade antimicrobiana da quitosana deve-se a presença de grupos amínicos que, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos de micro-organismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (CHUNG, Y.C.; CHEN, C.Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, v.99, p. 2806–2814, 2008). Estudos mais recentes revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está relacionado a uma mudança na permeabilidade da membrana externa do micro-organismo resultando em ruptura, devido às interações entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa do micro-organismo, resultando na perda de componentes intracelulares e morte da célula bacteriana (FENG, X.Q.; LI, X.F.; YANG, S., A Mechanism of Antibacterial Activity of Chitosan against Gram-negative Bacteria. *Food Science*, v.31, n.13, p.148-153, 2010; LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v.95, p.147–155, 2004; SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v.29, n.4, 2006). A utilização de coberturas com quitosana não só oferece uma grande vantagem física, mas também de prevenção contra o crescimento microbiano na superfície de alimentos.

(004) Dentro desta nova tendência tecnológica de preservação de alimentos, que consiste no desenvolvimento de materiais com capacidade de formação de película e

propriedades antimicrobianas que ajudem a melhorar a segurança alimentar e a vida de prateleira do alimento, é que se busca cada vez mais melhorar o potencial antimicrobiano dos revestimentos comestíveis através da incorporação de agentes antimicrobianos. Neste contexto, alguns compostos naturais podem ser utilizados para melhorar a atividade antimicrobiana do revestimento de quitosana, tais como os óleos essenciais, que são uma opção atraente de conservantes naturais (Alvarez, M.V.; Ponce, A.G.; Moreira, M.D.R. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, v.50, p.78-87, 2013). Estudos tem demonstrado que a adição de óleos essenciais em coberturas comestíveis ou em filmes de quitosana tem inibido vários tipos de fungos e bactérias patogênicas em vários tipos de alimentos (Ramos-García, M.; Bosquez-Molina, E.; Hernández-Romano, J.; Zavala-Padilla, G.; Terrés-Rojas, E.; Alia-Tejagal, I.; Barrera-Necha, L.; Hernández-López, M.; Bautista-Baños. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh Tomatoes. *Crop Protection*, v.38, p. 1-6, 2012).

(005) A *Myrcia ovata* Cambess, popularmente conhecida como “laranjinha do mato” ou “canelinha”, é uma árvore de aproximadamente 8m de altura que pertence a família Myrtaceae e possui cerca de 140 gêneros e 3000 espécies. As folhas desta árvore comumente são utilizadas como infusão, na medicina popular, para o tratamento de doenças gástricas e diarreia. Na literatura consultada foi encontrado apenas um artigo sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess, o qual demonstrou eficiência contra biofilme de *Enterococcus faecalis* (Cândido, C.S.; Portella, C.S.A.; Laranjeira, B.J.; Silva, S.S.; Arriaga, A.M.C.; Santiago, G.M.P.; Gomes, G.A.; Almeida, P.C.; Carvalho, C.B.M. Effects of *Myrcia ovata* Cambess. Essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p.621-627, 2010.). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa comprovaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess frente as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*, comumente encontradas como contaminantes em diversos tipos de alimentos. O potencial antimicrobiano pode ser atribuído à presença do ácido nelórico, o qual foi identificado por cromatografia gasosa no óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess como o composto majoritário de sua composição. O ácido nelórico tem sido comprovado exercer atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas (Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Schmidt, E.; Stoyanova, A.S.; Denkova, Z.; Nikolova, R.; Geissler, M.. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, v.19, p.288-291, 2007; Korenblum, E.; Goulart, F.R.V.; Rodrigues, I. A.; Abreu, F.; Lins, U.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Valoni, E.; Sebastián, G.V.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Seldin, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulphate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. *AMB Express*, v.3, n.44, p.1-8, 2013).

Diante disto, foi proposto nesta patente a elaboração de coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca e quitosana contendo o óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess como antimicrobiano natural.

(006) Na presente invenção foram elaboradas diferentes formulações de coberturas comestíveis variando-se as concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess. O potencial antimicrobiano destas coberturas foi avaliado através de experimentos *in vitro* frente às bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*, comumente encontradas em diversos tipos de alimentos.

ESTADO DA TÉCNICA

(007) Na literatura técnica consultada (sites de buscas de patentes) foram encontradas algumas patentes relacionadas à coberturas comestíveis de sorvete com o objetivo de melhorar propriedades de barreiras de umidade (WIPO 20140363542, WIPO 104210520, WIPO 2014006375, WIPO 2013083392, WIPO 2858670); Filmes contendo quitosana e xantana (WIPO 0002532180); Cobertura comestível antimicrobiana contendo quitosana e proteína isolada do amendoim (WIPO 103937272); Filme antibacteriano contendo quitosana e colágeno (WIPO 103570958); elaboração de um líquido para aplicação em coberturas comestíveis de frutas e vegetais (WIPO 103155973); filme protetor para produtos cárneos (WIPO 02352126).

(008) Nos sites de busca WIPO, INPI e Espacenet não foram encontradas patentes sobre coberturas comestíveis antimicrobianas de fécula de mandioca e quitosana contendo o óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess. No site de buscas de artigos científicos (www.sciencedirect.com) podem ser encontrados alguns trabalhos sobre coberturas comestíveis de quitosana contendo óleos essenciais tais como orégano, timo, bergamota, limão, canela cravo, calêndola, aloe vera e peixe (Alvarez, M.V.; Ponce, A.G.; Moreira, M.D.R. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, v.50, p.78-87, 2013; Chamanara, V.; Shabanpour, B.; Gorgin, S.; Khomeiri, M. An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, p.540–544, 2012; Fernández-Pan, I.; Carrión-Granda, X.; Maté J.I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, v.36, p.69-75, 2014; Perdonés, A.; Sanchez-Gonzalez, L.; Chiralt, A.; Vargas, M. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, v.70, p.32–41, 2012; Ramos-García, M.; Bosquez-Molina, E.; Hernández-Romano, J.; Zavala-Padilla, G.; Terrés-Rojas, E.; Alía-Tejagal, I.; Barrera-Necha, L.; Hernández-López, M.; Bautista-Baños, S. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds. to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh Tomatoes. *Crop Protection*, v.38, p.1-6, 2012; Sánchez-González, L.; Pastor, C.; Vargas, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C.; Cháfer, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, v.60, p.57–63, 2011; Santos, N.S.T.; Alves, A.J.A.; Aguiar A.; Oliveira, C.E.V.; Sales, C.V.; Silva, S.M.; Silva, R.S.; Stamford, T.C.M.; Souza, E.L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, v.32, p.345-353, 2012; Vu, K.D.; Hollingsworth, R.G.; Leroux, E.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, v.44, p.198–203, 2011; Xiao, C.; Zhu, L.;

Luo, W.; Song, X.; Deng, Y. Combined action of pure oxygen pretreatment and chitosan coating incorporated with rosemary extracts on the quality of fresh-cut pears. *Food Chemistry*, v.121, p.1003–1009, 2010; Xing, Y.; Li, X.; Xu, Q.; Yun, J.; Lu, Y.; Tang, Y. Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, v.124, p.1443–1450, 2011). Entretanto não foram encontrados registros de utilização do óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess como componente em coberturas comestíveis de à base de fécula de mandioca e quitosana.

(009) Baseado nestas pesquisas, verifica-se que a elaboração de coberturas comestíveis antibacterianas contendo fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess consiste em uma patente de caráter inovativo pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico foi publicado sobre a elaboração de coberturas comestíveis contendo estes componentes em conjunto. Pode-se ainda ressaltar que a tecnologia proposta apresenta caráter inovativo e de aplicação industrial, requisitos necessários para a concessão da patente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

(010) Diferentes formulações de coberturas foram elaboradas variando-se as concentrações de fécula de mandioca (entre 0% e 1%) (p/v), quitosana (entre 0% e 2%) (p/v) e óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess (entre 0% e 2,5%) (v/v). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa tem comprovado que concentrações de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial maiores que 1%, 2% e 2,5%, respectivamente podem aumentar o potencial antimicrobiano entretanto não são viáveis pois formam coberturas comestíveis heterogêneas e de difícil aplicação em alimentos. Além disto, concentrações maiores que 2,5% de óleo essencial torna a cobertura comestível com forte aroma, inviabilizando a sua aplicação em alimentos. Como consequência, qualquer outra formulação contendo porcentagens maiores destes componentes não poderá ser caracterizada como inovativa. Com o intuito de minimizar o número de experimentos e abranger as faixas de concentrações propostas foram realizadas combinações das concentrações dos componentes de acordo com o delineamento composto central rotacional 2³ com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais conforme descrito por Rodrigues & Iemma, totalizando 17 formulações (Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Experimental design and process optimization*. Campinas: Cárita Editora, 2012). Devido à alta competitividade, não há no mercado, espaço para processos de otimização demorados, com elevado custo e pouco confiáveis do ponto de vista estatístico. Por este motivo, o planejamento de experimentos é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos, além de reduzir os custos e a perda de tempo (Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Experimental design and process optimization*. Campinas: Cárita Editora, 2012).

(011) Para cada formulação de cobertura de quitosana preparou-se separadamente uma solução de quitosana e uma solução de fécula de mandioca conforme procedimento a seguir. Foi preparada 100 mL de solução de quitosana em solução aquosa de ácido acético a 1,5% (p/v) contendo 1,28 g de glicerol, agitando-se até completa homogeneização. Em seguida, preparou-se 100 mL de solução de fécula de mandioca em solução aquosa de glicerol à 0,64% (p/v). A solução de fécula foi aquecida em banho-maria sob agitação, não ultrapassando 70°C. Após o resfriamento para temperatura ambiente (em torno de 25°C), a solução de fécula foi adicionada à solução de quitosana, agitando-se até completa homogeneização das mesmas. Por fim adicionou-se o óleo essencial. Todas as formulações de coberturas foram preparadas de

acordo com este procedimento variando-se as porcentagens de quitosana, fécula de mandioca e óleo essencial conforme descrito anteriormente.

(012) Todas as formulações de coberturas comestíveis foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), através da técnica de Disco-difusão, segundo metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (*Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard: eleventh edition*, M02-11. Wayne, PA: CLSI; 2012). Inicialmente preparou-se as suspensões bacterianas em caldo Muller hinton ajustadas para a concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL utilizando o padrão 0,5 da escala MacFarland. Em seguida, cada suspensão microbiana foi espalhada em placas estéreis contendo o ágar Mueller-Hinton, com o auxílio de swabs de algodão estéreis. Discos de papel filtro contendo 6 mm de diâmetro foram previamente esterilizados. Em cada disco foram colocados 15 µL de cobertura de comestível e estes foram colocados em cima da superfície do meio ágar Muller hinton contendo as suspensões bacterianas. Em seguida, as placas foram invertidas e colocadas em estufa, a 35°C por 24 horas. Após este tempo, efetuou-se a medição dos diâmetros dos halos de inibição formados nas placas de Petri. Os diâmetros de halos de inibição (mm) obtidos foram: entre 8,0 e 11,5 mm para *B. cereus*, entre 8,7 e 11,5 mm para *B. subtilis*, entre 7,0 e 10,0 mm para *S. aureus*, entre 7,0 e 14,0 para *E. faecalis*, entre 8,3 e 18,0 mm para *P. aeruginosa*, entre 7,0 e 9,0 mm para *S. marcescens* e entre 6,0 e 9,5 mm para *S. enteritidis*. Djenane e colaboradores classificaram a sensibilidade de micro-organismos a óleos essenciais de acordo com o diâmetro de halo de inibição como segue: não sensível para diâmetros menores que 8,0 mm, sensível para diâmetros entre 9,0 e 14,0 mm, muito sensível para diâmetros entre 15,0 e 19,0mm e extremamente sensível para diâmetros maiores que 20,0 mm (Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M. & Roncalés P. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22, 1046-1053, 2011). Tendo em vista que não há uma classificação específica para coberturas comestíveis, foi utilizada a interpretação de Djenane e colaboradores para avaliar o potencial antimicrobiano das coberturas comestíveis desta patente. Diante disto, verificou-se que *S. marcescens* e *S. enteritidis* não foram sensíveis, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. faecalis* foram sensíveis e *P. aeruginosa* foi muito sensível às coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess.

(013) A descrição realizada até aqui refere-se ao potencial antimicrobiano *in vitro* de coberturas comestíveis elaboradas a partir de fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess frente as bactérias patogênicas *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. O caráter inovativo desta patente é a elaboração de coberturas comestíveis a base de fécula mandioca, quitosana e óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess, as quais podem exercer efeito antimicrobiano não somente frente as bactérias testadas, como também frente a outras bactérias patogênicas ou não e fungos patogênicos ou não. Estas coberturas comestíveis quando aplicadas em alimentos também poderão exercer efeito antimicrobiano contra a flora microbiana natural dos mesmos durante o período de armazenamento. As coberturas comestíveis podem substituir as embalagens convencionais de alimentos portanto este produto seria de

6/6

grande interesse comercial tanto para as indústrias de embalagens como indústrias de alimentos. A formulação de cobertura comestível mais adequada poderia ser elaborada pelas próprias indústrias aplicando-as diretamente no alimento ou alternativamente poderia ser elaborada por indústrias de embalagens e comercializadas para as indústrias de alimentos.

RESUMO

“FORMULAÇÕES DE COBERTURAS COMESTÍVEIS ANTIMICROBIANAS”

(001) A presente invenção consiste na elaboração de diferentes formulações de coberturas comestíveis variando-se as concentrações de fécula de mandioca (entre 0 e 1%), quitosana (entre 0 e 2%) e óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess (entre 0 e 2,5%). O potencial antimicrobiano destas coberturas foi avaliado através de experimentos *in vitro* frente às bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*, comumente encontradas em diversos tipos de alimentos. As bactérias *S. marcescens* e *S. enteritidis* não foram sensíveis, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. faecalis* foram sensíveis e *P. aeruginosa* foi muito sensível às coberturas comestíveis. A inovação do trabalho foi a incorporação do óleo essencial *Myrcia ovata* Cambess, conhecido popularmente como “laranjinha do mato”, em coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca e quitosana. A incorporação de óleos essenciais em coberturas comestíveis contribui para o potencial antimicrobiano das mesmas. A utilização do óleo de *Myrcia ovata* Cambess nas coberturas comestíveis de fécula de mandioca e quitosana agregaria valor à esta planta tornando-se uma fonte alternativa de renda para os agricultores. Além disto, a elaboração de coberturas comestíveis antimicrobianas contendo os componentes naturais fécula de mandioca, quitosana e óleo essencial de *Myrcia ovata* Cambess seria de grande interesse industrial para aumentar a vida de prateleira dos alimentos, como uma alternativa às embalagens convencionais, visto que é cada vez mais crescente a demanda por parte dos consumidores de alimentos seguros e contendo antimicrobianos naturais.